



Diversité des archées et implication de la composante procaryote dans le cycle biogéochimique du méthane en milieu aquatique continental : études taxonomiques et fonctionnelles dans la colonne d'eau et les sédiments anoxiques du lac Pavin

Guillaume Borrel

► **To cite this version:**

Guillaume Borrel. Diversité des archées et implication de la composante procaryote dans le cycle biogéochimique du méthane en milieu aquatique continental : études taxonomiques et fonctionnelles dans la colonne d'eau et les sédiments anoxiques du lac Pavin. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22176 . tel-00932300

HAL Id: tel-00932300

<https://theses.hal.science/tel-00932300>

Submitted on 16 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE et
ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre 560

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité: **Ecologie Microbienne**)

Soutenance prévue le 07 Novembre 2011

Guillaume BORREL

**Diversité des archées et implication de la composante
procaryote dans le cycle biogéochimique du méthane en
milieu aquatique continental : études taxonomiques et
fonctionnelles dans la colonne d'eau et les sédiments
anoxiques du Lac Pavin**

Président : **Amblard Christian**, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd, France

Rapporteur : **Gribaldo Simonetta**, Institut Pasteur, Paris, France

Rapporteur : **Ollivier Bernard**, IRD, Marseille, France

Examineur : **Bouvier Thierry**, Université de Montpellier 2, Montpellier, France

Examineur : **Jeanthon Christian**, CNRS & UPMC, Roscoff, France

Examineur : **Jézéquel Didier**, Université Paris Diderot-Paris 7, Paris, France

Directeur de thèse : **Fonty Gérard**, Université Blaise Pascal, Clermont-Fd, France

Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", Unité Mixte de Recherche 6023

CNRS / Université Blaise Pascal

24, Avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex

Remerciements

Je remercie la Région Auvergne pour le financement de cette thèse. Ce travail de recherche a été mené au sein de l'équipe "Virus et Métabolismes Microbiens en milieu aquatique" du laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement" (LMGE). Je tiens à remercier Christian Amblard pour son accueil au sein du laboratoire.

Mes remerciements vont aux rapporteurs et aux examinateurs pour leur engagement dans l'évaluation de ce travail ainsi que pour leurs retours constructifs.

Cette thèse a été encadrée par Gérard Fonty. Merci Gérard pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de poursuivre l'étude des communautés microbiennes du Lac Pavin à la suite de mon stage de Master 2. Merci pour votre soutien, vos conseils éclairés et les discussions enrichissantes que nous avons eu. Anne-Catherine Lehours a également très largement participé à la concrétisation de ce travail. Merci pour ton aide précieuse, essentielle, dans de nombreux moments clefs. J'espère que les mystères de notre lac préféré te passionneront encore longtemps.

Un très grand merci à Didier Jézéquel de l'Institut de Physique du Globe de Paris. Merci Didier pour ta passion contagieuse du Pavin. Les nombreuses explications que tu m'as données m'ont été d'une grande aide pour mieux appréhender ce système si particulier. Je garde un sacré souvenir de notre expédition sur la glace !

Je remercie Nicole Morel et Jean-Pierre Morel-Desrosiers pour toute l'énergie qu'ils ont investie dans la réalisation des nombreuses mesures microcalorimétriques sur les échantillons du Pavin, ainsi que dans la mise en place des systèmes de renouvellement de la phase gazeuse des ampoules (un vrai défi avec la sensibilité des microcalorimètres !).

Merci à Keith Joblin, venu de Nouvelle-Zélande pour une collaboration de 6 mois au LMGE alors que je commençais ma thèse. Ce fut une vraie chance de pouvoir apprendre les rudiments de la culture anaérobie avec lui. Son soutien et ses conseils n'ont pas tari après son départ. J'espère que nos échanges se poursuivront encore longtemps.

Merci à Téléphore Sime-Ngando pour avoir soutenu et favorisé ma participation à l'étude des communautés virales dans les sédiments du Lac Pavin. Ces travaux furent extrêmement stimulants et formateurs; je suis heureux d'avoir pu m'y investir.

Lionel Jouve et Jonathan Colombet m'ont énormément aidé pour les sorties sur le terrain, toujours vaillant sur le "pont" de notre barque, souvent le mot pour rire, même dans les pires conditions climatiques (cette charmante neige de printemps...). Jo, la recherche des virus dans l'obscurité de la salle du MET et nos longues discussions autour de la rédaction de l'étude associée resteront de grands moments dans ma thèse. Au-delà du terrain et du cadre scientifique en général, j'ai eu un grand plaisir à collaborer avec toi.

Merci à Corinne Bardot pour sa formation rigoureuse aux techniques de biologie moléculaire en amont de ma thèse et qui a été (qui reste) extrêmement précieuse pour la suite. Merci aussi à Olivier Crouzet pour ses conseils nombreux et avisés concernant la PCR quantitative.

Merci à Annie Guedon pour son aide dans la préparation des milieux de culture. Mes chères méthanogènes les ont toujours énormément appréciés, et moi aussi du même coup ! Merci aussi à Emilie Duffaud (2d2u2f) pour ses petits coups de mains toujours bienvenus.

Merci beaucoup à Yvette Dumas, Nathalie Fruquière et Brigitte Chebance pour avoir toujours réglé les différents problèmes administratifs dans les temps et avec une patience renouvelée. Merci aussi Brigitte pour la super déco de mon pot de thèse.

Mes joyeux compères du bureau jaune, Jérémy, Régis, Aurélie, Basil et Emilie (qui a ensuite fui), ce fut un réel plaisir de partager avec vous ces années parsemées de parties de Palets (je te gagnerai un jour Jérémy !) ou encore d'Agricola (je te gagnerai un jour Régis !). Jérémy, génial inventeur à tes heures perdues et toujours une marotte en tête, notamment celle qui nous mena à aller bivouaquer dans la tourmente de l'hiver, mais attention, sans raquettes sinon ça n'aurait pas été drôle... Une fraîche aventure, partagée avec le Jeff, toujours partant ! Jeff, merci pour toutes tes découvertes musicales, pour nos grandes discussions autour d'une bière, dont aucune ne fut meilleure que celle que nous avons brassée. Manu, nous nous sommes mesurés à Jo-le-spectre et aux mutants de Casamur, et s'il est sûr que le premier ne nous hantera plus, il est tout aussi certain que les seconds resteront toujours les plus forts. Marion, je ne te demanderai pas quel temps il fait à Vernines mais je garde de délicieux souvenirs des raclettes dégustées là-bas. Chef Hélène, avec le recul je ne sais pas comment tu

as réussi à nous mettre en tête cette idée que tu étais "la chef", trop forte, un concentré explosif de bonne humeur et de fous rires communicatifs. Faut dire que Charly n'était jamais très loin pour allumer la mèche avec ses jeux de mots, un maître du genre ! Toujours la porte ouverte à mes petits creux, merci Marlène et Serena pour toutes ces bonnes discussions autour d'un cookie et d'une tasse de café. Marie, merci pour tes super conseils de bouquins (Les Falsificateurs !) et nos sorties cinoch'. Merci à mes acolytes des M(G)FP, nos sessions de musique foutraques furent de vraies bouffées d'air pur à la fin de ma thèse. J'attendais toujours ces moments avec impatience. Une pensée pour Bashir, un vrai chef en cuisine et toujours le cœur sur la main.

...je freine ici, de peur que ces remerciements ne tournent à l'écriture d'un second manuscrit... Mes pensées sincères vont aux nombreuses autres personnes avec qui j'ai eu la joie de partager ces belles années. Je garde en mémoire tant de bons moments et une foule de rencontres enrichissantes. Des moments quotidiens aussi, pouvant paraître anodins, mais qui parfois me manquent terriblement.

Je remercie toute ma petite famille pour son soutien. J'aurais aimé être plus souvent présent à vos côtés ces dernières années. De manière plus terre à terre, merci papa pour ta relecture minutieuse du manuscrit afin de traquer les dernières fautes d'orthographe.

Evidemment, le Lac Pavin, ses eaux calmes et sombres enveloppées de brume au matin... mais il y eu aussi le lac de Servièrre une après-midi de fin d'été, la Godivelle un poil trop haut, Montcineyre pour les ricochets, Aydat et ses blooms flashy... Mélanie, j'ai hâte qu'on les redécouvre encore. Qu'il y en ait de nombreux autres, ici ou ailleurs.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1ère Partie : Les Archaea : le plus énigmatique des trois domaines de la vie.....	17
I- Découverte et origine du troisième domaine	17
II- Extension de nos connaissances sur la diversité taxonomique et fonctionnelle du troisième monde : apports de l'écologie moléculaire.....	21
II.1. De 2 à 6 phyla archéens.....	21
II.2. Distribution environnementale et écologie des archées	25
II.2.a. Des organismes cosmopolites, abondants... ..	25
II.2.b. ... et majoritairement inconnus	25
II.2.c. Facteurs environnementaux influençant la distribution globale des archées	27
II.2.d. Un trait écologique commun unifiant les archées ?	29
II.3. Diversité taxonomique et fonctionnelle au sein des 6 phyla archéens.....	31
II.3.a. Les Euryarchaeota	31
II.3.b. Les Crenarchaeota	37
II.3.c. Les Korarchaeota	39
II.3.d. Les Nanoarchaeota.....	39
II.3.e. Les Thaumarchaeota	39
II.3.f. Les Aigarchaeota	41
2 ^{nde} Partie : Les virus d'archées, intrigants, diversifiés et... encore peu connus.....	43
I- Les "cycles de vie" des virus	43
I.1. Les cycles lytiques et lysogéniques (Fig. 12).....	45
I.2. Les cycles chroniques et pseudolysogéniques (Fig. 12)	45
II- Bref état de l'art sur les rôles des virus dans l'environnement : exemples dans les systèmes aquatiques	47
II.1. Rôles identifiés des virus dans les écosystèmes aquatiques aérobies et mésophiles	47
II.1.a. Les virus : agents clés des cycles biogéochimiques.	47
II.1.b. Les virus : agents clés de la diversité microbienne (Fig. 15).....	49
II.1.c. Les virus : agents clés dans les transferts de matériel génétique (Fig. 15)	49
II.2. Rôles des virus dans d'autres écosystèmes.....	51
III- Les virus d'archées	51
III.1. Une diversité virale archéenne remarquable, atypique et spécifique	51

III.2. Les virus d'archées dans l'environnement	53
III.2.a. Virosphère archéenne des environnements hypersalins et géothermaux	55
III.2.b. Les virus d'archées dans les environnements non extrêmes	59
3ème Partie : Le méthane, un métabolite spécifiquement issu de l'activité des archées - Un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques lacustres.....	61
I- Le méthane.....	61
I.1. Généralités	61
I.2. Origine du méthane atmosphérique	63
I.3. Oxydation du méthane	65
II- Budget et transport du méthane dans les écosystèmes lacustres	65
II.1. Le CH ₄ : un des principaux métabolites terminaux de la dégradation de la matière organique	65
II.2. Transport du méthane dans les lacs.....	67
II.3. Emissions de méthane.....	69
III- Production et consommation de méthane dans les écosystèmes lacustres dulçaquicoles (Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems)	69
PRESENTATION DU SITE D'ÉTUDE	113
I- Origine et méromicticité du Lac Pavin	115
II- Caractéristiques de la colonne d'eau	117
II.1. Répartition des composés chimiques.....	117
II.2. Le méthane dans la colonne d'eau.....	117
II.2.a. Profil de concentration et émissions.....	119
II.2.b. Origine et consommation du méthane : données isotopiques.....	119
II.2.c. Voies d'oxydation du méthane dans la colonne d'eau : approche de modélisation.	121
III- Caractéristiques des sédiments profonds.....	123
III.1. Origine et composition des particules sédimentaires.....	123
III.1.a. La silice.....	123
III.1.b. Le fer particulaire	125
III.1.c. Le carbone organique	125
III.2. Caractéristiques physicochimiques de l'eau interstitielle	127
III.3. Le méthane dans les sédiments	127
IV- Etudes microbiologiques.....	127

IV.1. Implication de la communauté procaryote dans le cycle du soufre, du fer et du méthane	129
IV.1.a. La communauté bactérienne	129
IV.1.b. La communauté archéenne	131
IV.2. Impact des virus sur les communautés microbiennes anaérobies	133
CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DES COMMUNAUTES PROCARYOTES IMPLIQUEES DANS LE CYCLE DU METHANE AU NIVEAU DE LA COLONNE D'EAU ET DES SEDIMENTS SUPERFICIELS.....	135
Introduction.....	137
Etude 1: Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake.....	139
Etudes complémentaires sur les communautés méthanotrophes dans la colonne d'eau du Lac Pavin	171
I- Etude de la méthanotrophie aérobie dans la colonne d'eau du Lac Pavin par des approches culturales et microcalorimétriques	171
I.1. Principales observations réalisées au cours de l'étude 1 ayant orienté les approches culturales et écophysiologiques.	171
I.2. Essais d'isolement de souches méthanotrophes aérobies et approches éco-physiologiques en microcalorimétrie.....	173
I.2.a Objectifs.....	173
I.2.b Principaux résultats obtenus sur l'isolement de souches méthanotrophes aérobies	173
I.2.c Approches microcalorimétriques sur souches isolées	175
II- Etude du processus d'oxydation anaérobie du méthane : enrichissements et approches microcalorimétriques	177
II.1. Données géochimiques suggérant l'existence de ce processus dans la zone anoxique du Lac Pavin	177
II.2. Essais d'enrichissements de souches méthanotrophes anaérobies et approches microcalorimétriques sur échantillons naturels.....	179
II.2.a. Objectifs et stratégie	179
II.2.b. Résultats obtenus.....	181
II.3. Recherche de séquences d'ARNr16S de la lignée Mx	183
II.3.a. Données bibliographiques et principales observations réalisées au cours de l'étude 1 ayant orienté cette étude.....	183
II.3.b. Objectifs et stratégie	183
II.3.c. Résultats et discussion.....	185
Discussion et Conclusion du chapitre 1.....	189

I- Méthanogènes et Méthanogenèse	189
II- Méthanotrophes et méthanotrophie.....	189
CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES COMMUNAUTES D'ARCHEES CANDIDATES ET METHANOGENES DANS LES SEDIMENTS DU MONIMOLIMNION	193
Introduction.....	195
Etude 2: Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages.....	197
Etude 3: <i>Methanobacterium lacus</i> sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the deep cold sediment of a meromictic lake.	233
Discussion et Conclusion du chapitre 2.....	245
I- Caractérisation des changements verticaux dans la communauté d'archées des sédiments du monimolimnion	247
II- Place des méthanogènes obtenues en culture dans la communauté d'archées des sédiments	249
II.1. Les Methanobacteriales	249
II.2. Exemples de facteurs environnementaux prévalant dans les sédiments et pouvant conditionner la dynamique des Methanobacteriales : exemple de la souche 17A1 ^T	251
CHAPITRE 3 : ACTIVITE VIRALE ET POTENTIELLE IMPLICATION DES VIRUS DANS LA REGULATION DES COMMUNAUTES D'ARCHEES DU SEDIMENT DU MONIMOLIMNION	255
Introduction.....	257
Etude 4: Viral activity and unexpected viral morphotypes in the sediments of a deep-dark freshwater biosphere	259
Discussion et Conclusion du chapitre 3.....	285
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	289
I- Le CH ₄ : un métabolite clé de la minéralisation de la matière organique en milieu lacustre ..	292
I.1. Quelle source principale de méthane : la colonne d'eau anoxique ou les sédiments du Pavin ?	292
I.2. Les méthanogènes : Composition et structure des populations.....	293
I.3. La méthanogenèse acétoclaste est-elle la principale voie de formation du méthane ?.....	294
I.4. Facteurs environnementaux affectant l'activité des méthanogènes dans la zone anoxique du Lac Pavin.....	295
I.5. Des taxons de méthanogènes « adaptés aux environnements lacustres » ?	295
I.6 Une "banque de graines" méthanogènes	296

I.7. La physiologie des méthanogènes dominants les systèmes lacustres reste inconnue.....	297
II- Régulation des émissions de méthane.....	298
II.1 Hypothèses sur les voies de transport du méthane.....	298
II.2. Méthanotrophie aérobie	298
II.2.a. Activité des méthanotrophes aérobies dans la colonne d'eau	299
II.2.b. Methylobacter : superconsommateur de méthane dans les lacs.....	299
II.2.c. Methylocystis.....	300
II.3. Oxydation anaérobie du méthane : Importance, microorganismes impliqués et perspectives pour l'étude de ce processus en milieu aquatique continental.....	300
II.3.a. L'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification : le processus clé des systèmes aquatiques d'eau douce ?	300
II.3.b. Recherche de groupes taxonomiques clairement identifiés dans le processus de NDMO.....	301
II.3.c. D'autres processus d'oxydation anaérobie du méthane impliquant d'autres groupes taxonomiques ?	301
II.3.d. Une attention particulière pour la lignée MBG-D	302
III- Diversité des virus benthiques et leur influence sur les communautés procaryotes	303
III.1. Une potentielle infection des méthanogènes et des archées par les virus dans les sédiments du Lac Pavin	303
III.2 Rôles potentiels des virus dans le fonctionnement de la communauté des sédiments..	305
IV- Perspectives générales sur les communautés des sédiments du Lac Pavin.....	306
REFERENCES	311
LISTE DES ABBREVIATIONS	343
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	347
ANNEXES	361

INTRODUCTION GENERALE

Apparus il y a plus de 3,5 milliards d'années, les microorganismes ont dominé la plus grande partie de l'histoire du vivant et constituent actuellement une composante majeure de la biodiversité. Ils sont répartis au sein des 3 domaines du vivant et représentent l'ensemble des domaines *Archaea* et *Bacteria*. Au cours de leur longue évolution ils ont colonisé chaque recoin de notre Terre en innovant de nouvelles voies métaboliques leur permettant de s'adapter à des conditions environnementales toujours plus variées. Au fur et à mesure de leur apparition, ces différentes voies métaboliques ont bouleversé les cycles élémentaires et conduit à modeler une partie de l'environnement dans lequel nous évoluons aujourd'hui. En raison de leur versatilité métabolique et de leur importante biomasse globale (équivalente à celle des plantes en terme de carbone), les microorganismes sont un des moteurs essentiels des cycles biogéochimiques.

Découverts il y a plus de 300 ans par Leeuwenhoek (drapier de métier !), les microorganismes ont pourtant longtemps été considérés comme une composante négligeable du vivant. La reconnaissance de leur importance a considérablement progressé au cours du siècle dernier grâce à l'isolement et à la caractérisation de groupes fonctionnels clés. Les vingt dernières années, l'émergence des outils moléculaires a conduit à la réévaluation de leur distribution environnementale et de leur diversité. Certains groupes fonctionnels affiliés aux *Archaea* et *Bacteria* sont aujourd'hui le centre d'attention de nombreux chercheurs en raison de leur implication dans des processus sensibles aux perturbations anthropiques et pouvant affecter notre environnement de manière globale et durable. Il s'agit notamment des microorganismes impliqués dans le cycle du méthane qui est un des principaux gaz à effet de serre. Les producteurs de méthane (méthanogènes) connus sont exclusivement affiliés aux *Archaea*, alors que les microorganismes impliqués dans sa consommation sont affiliés aux *Bacteria* et aux *Archaea*. Certains de ces acteurs restent à découvrir, et révéleront probablement des métabolismes originaux et informatifs quant à l'évolution du vivant. D'un environnement à l'autre, les méthanotrophes et les méthanogènes sont régulées par un vaste panel de facteurs qu'il est nécessaire d'appréhender afin de compléter les modèles

biogéochimiques utilisés pour prédire les évolutions climatiques et améliorer la gestion des environnements naturels.

Les lacs sont des sources importantes de méthane, potentiellement à l'origine de 6 à 16% des émissions naturelles de méthane (Bastviken *et al.*, 2004). Il apparaît donc essentiel de mieux connaître les communautés impliquées dans la production et la consommation de ce métabolite, ainsi que les facteurs régulant leur activité au sein de ces écosystèmes. Le Lac Pavin, unique lac méromictique en France, a fait l'objet de nombreuses investigations géochimiques et microbiologiques. Les données issues de ces travaux ont révélé que ce lac constitue un modèle d'étude pertinent pour la compréhension du cycle du méthane en milieux lacustre. En premier lieu, il est notable qu'en dépit de fortes concentrations en méthane dans sa partie profonde, le Lac Pavin émet environ dix fois moins de méthane que les lacs situés aux mêmes latitudes. Les profils de concentration en méthane ainsi que ceux de différents accepteurs d'électrons suggèrent que l'oxydation du méthane dans la colonne d'eau pourrait impliquer à la fois des communautés aérobies et anaérobies, expliquant potentiellement l'efficacité de sa consommation. Cependant aucune investigation n'avait encore été conduite sur les communautés méthanotrophes. Au cours de cette thèse, la structure, la répartition et l'activité potentielle de la communauté de méthanotrophes aérobies ont été appréhendées. Des approches culturales ont été mises en œuvre afin d'isoler des souches modèles, nécessaires à la détermination des paramètres environnementaux régulant l'activité des représentants de ce groupe fonctionnel. D'autre part le processus d'oxydation anaérobie du méthane a été examiné à l'aide d'approches de microcalorimétrie. Les plus récentes études conduites dans la zone anoxique permanente (Lehours *et al.*, 2005; 2007) avaient mis en évidence que les archées étaient principalement composées de méthanogènes et dominaient la communauté procaryote, expliquant potentiellement les fortes concentrations en méthane mesurées dans cette zone. Ces informations ont été complétées dans le cadre de cette thèse en déterminant la structure et l'activité de ce groupe métabolique dans la colonne d'eau anoxique.

Si le compartiment pélagique anoxique avait fait l'objet d'études ultérieures, complétées dans le cadre de cette thèse, la communauté benthique de cet écosystème représentait encore une boîte noire. Pourtant, les profils de méthane établis dans les sédiments anoxiques ont révélé que la plus grande partie de la méthanogenèse pourrait prendre place au niveau de celui-ci. L'étude de cette strate sédimentaire apparaissait ainsi primordiale pour appréhender le cycle du méthane. Ainsi, des approches dépendantes et indépendantes de la

culture ont été mises en œuvre afin d'explorer la diversité des archées méthanogènes de ce compartiment et de rechercher les facteurs pouvant affecter leur répartition. Ces études nous ont conduit à isoler une nouvelle espèce méthanogène affiliée au genre *Methanobacterium* et, ont révélé une distribution et une diversité archéenne étonnante, ne se limitant pas aux seules méthanogènes. La distribution dichotomique des communautés archéennes observées dans les sédiments nous a mené à nous interroger sur les facteurs de régulation influençant les différentes populations. Les facteurs abiotiques ne semblant pas expliquer à eux seuls cette répartition, des études ont été entreprises afin d'analyser la régulation possible de ces populations par les virus.

L'impact des virus sur les communautés microbiennes benthiques reste encore peu étudié et demeure incertain. En raison des forts taux d'infection dans la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin (Colombet *et al.*, 2006), il nous est apparu possible que les virus puissent aussi être infectieux dans les sédiments du monimolimnion. Une partie de la communauté de ce compartiment étant impliquée indirectement (bactéries) ou directement (archées) dans la production de méthane, l'activité virale en interaction avec l'un ou l'autre de ces compartiments (ou les deux) pourrait avoir un rôle régulateur sur ce processus. L'étude menée sur les virus benthiques du Lac Pavin avait pour objectif d'examiner la possible activité des virus dans ce compartiment ainsi que leur interaction avec la composante bactérienne et/ou archéenne.

Dans une première partie de ce manuscrit sera proposée une revue bibliographique sur le domaine des *Archaea* et leur virus, ainsi que sur les communautés microbiennes impliquées dans le cycle biogéochimique du méthane dans les écosystèmes lacustres. La présentation des principales caractéristiques du site d'étude (Lac Pavin) fera suite à la revue bibliographique. La seconde partie du manuscrit, présentant les résultats obtenus, sera divisée en trois chapitres. Dans le premier chapitre, les résultats des études conduites sur les communautés méthanogènes et méthanotrophes de la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin seront présentés sous forme d'un article et d'une section dans laquelle des données complémentaires, mais encore préliminaires, seront exposées. Les études relatives aux communautés d'archées des sédiments et à l'activité potentielle des virus dans ce compartiment feront l'objet des chapitres suivants.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

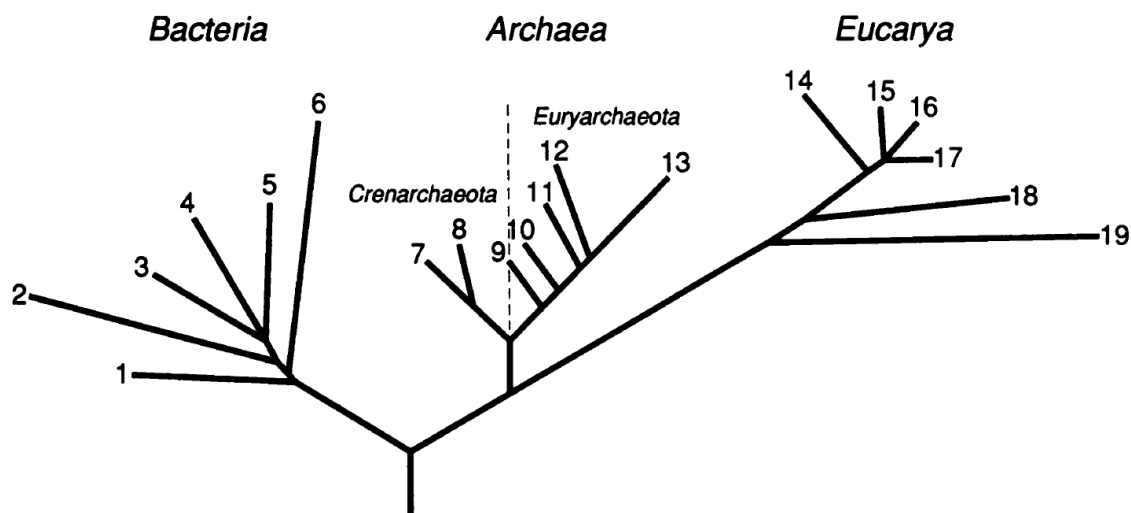


Figure 1 : Premier arbre phylogénétique représentant les 3 domaines du vivant, basé sur les séquences de l'ARN ribosomal, d'après Woese (1990).

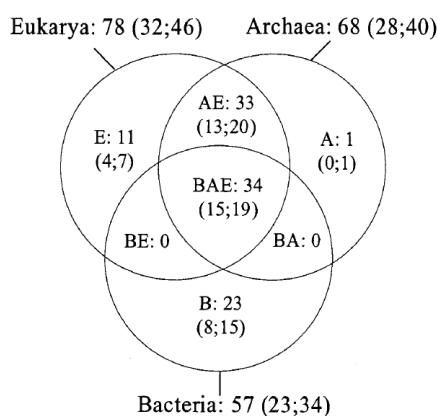


Figure 2 : Diagramme de Venn illustrant la distribution générale des familles de protéines ribosomales entre les trois domaines : Bacteria (B), Archaea (A), Eucarya (E). Le nombre de familles est indiqué sous chaque ensemble, d'après Lecompte *et al.*, (2002).

1ère Partie : Les Archaea : le plus énigmatique des trois domaines de la vie...

I- Découverte et origine du troisième domaine

Des souches d'archées ont été cultivées et décrites depuis plus de 100 ans (Cavicchioli, 2010), cependant, elles ont longtemps été assimilées aux bactéries en raison de leur grande similitude phénotypique. La reconnaissance des *Archaea* en tant que troisième domaine du vivant (Woese *et al.*, 1990) est relativement récente dans l'histoire de la microbiologie et résulte de l'utilisation de données moléculaires, plutôt que de données phénotypiques, pour décrire les relations évolutives (*i.e.* la phylogénie) entre les organismes vivants (Zuckerandl and Pauling, 1965).

Dans les années 70, les travaux menés par Carl Woese et ses collaborateurs ont permis d'établir les relations phylogénétiques existant au sein des *Procaryotes*, et entre les *Procaryotes* et les *Eucaryotes*, en se basant sur les séquences de l'ARN ribosomique (ARNr, (Woese *et al.*, 1975; Woese and Fox, 1977)). Cette molécule a été choisie en raison de son universalité au sein du vivant et de la présence de régions fortement conservées permettant d'établir des relations évolutives entre espèces extrêmement éloignées (Woese *et al.*, 1975). La comparaison des séquences d'ARNr 18S et 16S d'organismes *Eukaryotes* et *Procaryotes* a ainsi révélé que les archées présentaient une signature distincte de celle des *Bacteria* et des *Eukaryotes* (Fox *et al.*, 1977; Woese and Fox, 1977) et, en 1990, une description formelle du monde vivant répartie en 3 domaines fut proposée (Fig. 1, (Woese *et al.*, 1990)). La mise en évidence de l'existence de deux mondes procaryotes fut une véritable révolution de la perception évolutive du vivant, et, outre ces considérations phylogénétiques, les archées et les bactéries diffèrent sur plusieurs aspects biochimiques et structuraux fondamentaux. Chacun de ces domaines procaryotes présente une structure ribosomale et des protéines ribosomales spécifiques (Fig. 2, (Lecompte *et al.*, 2002)). La machinerie de réplication de l'ADN est également très différente entre ces deux domaines procaryotiques (Leipe *et al.*, 1999). En revanche le génome des archées comporte des gènes métaboliques plus proches de ceux des bactéries que de ceux des eucaryotes (Tableau 1). Le génome des archées présente ainsi une

Trait	Bacteria	Archaea	Eukarya
Carbon linkage of lipids	Ester	Ether	Ester
Phosphate backbone of lipids	Glycerol-3-phosphate	Glycerol-1-phosphate	Glycerol-3-phosphate
Metabolism	Bacterial	Bacterial-like	Eukaryotic
Core transcription apparatus	Bacterial	Eukaryotic-like	Eukaryotic
Translation elongation factors	Bacterial	Eukaryotic-like	Eukaryotic
Nucleus	No	No	Yes
Organelles	No	No	Yes
Methanogenesis	No	Yes	No
Pathogens	Yes	No	Yes

Tableau 1 : Comparaison d'attributs biochimiques, métaboliques et physiologiques entre *Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya*. Ces traits sont établis pour la grande majorité des organismes affiliés à ces domaines, néanmoins certaines exceptions existent. Par exemple, les haloarchaea possèdent souvent des organelles sous forme de vésicules de gaz, mais la plupart des archaea ne possèdent pas d'organelles, d'après Cavicchioli (2010).

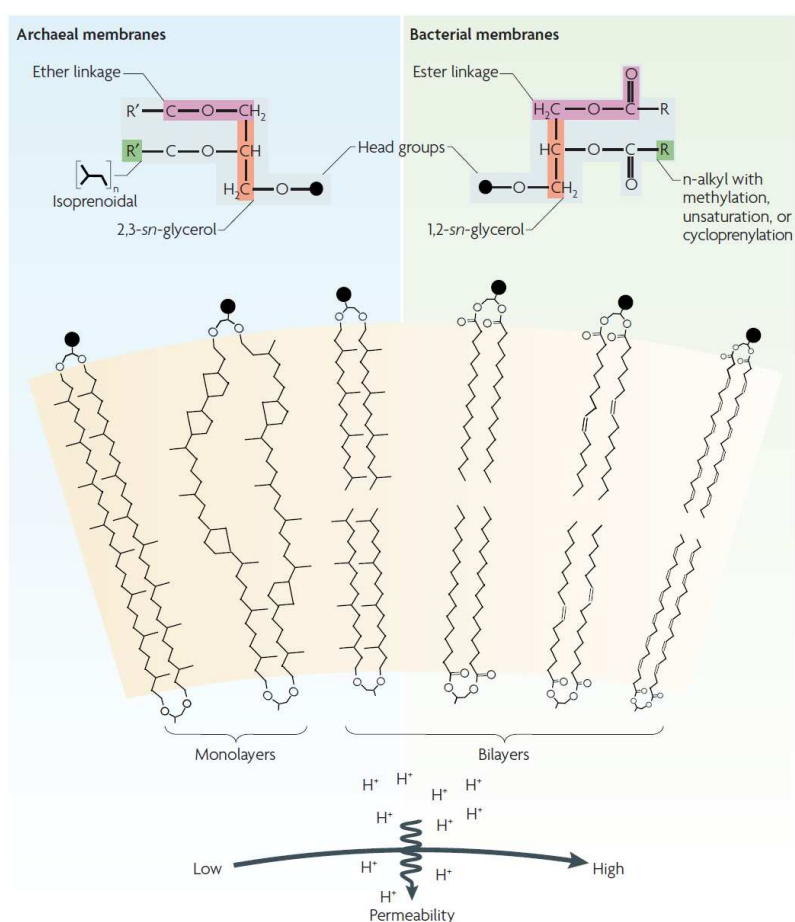


Figure 3 : Propriétés des lipides et des membranes des archées (à gauche), des bactéries (à droite). Les membranes des eucaryotes sont semblables à celles des bactéries. La flèche située sous les membranes indique la tendance générale d'augmentation de la perméabilité de ces membranes au passage d'ions tels que les protons ou le sodium, d'après Valentine (2007).

nature chimérique en comprenant des gènes métaboliques bactériens et des gènes de protéines traductionnelles et transcriptionnelles eucaryotes (Barry and Bell, 2006; Werner, 2007). Les membranes cytoplasmiques archéennes sont composées de lipides formés de chaînes d'alcool isoprénique attachées au glycérol par des liaisons éther, alors que les lipides membranaires des bactéries et des eucaryotes sont composés de l'assemblage de deux chaînes d'acides gras avec une molécule de glycérol par l'intermédiaire d'une liaison ester (Tornabene and Langworthy, 1979; De Rosa *et al.*, 1986; Matsumi *et al.*, 2010). De plus les lipides d'archées peuvent être bipolaires (2 glycérols, 4 liaisons éthers) contrairement aux lipides bactériens et eucaryotes (Tableau 1, Fig. 3).

Ces différences structurales et biochimiques, ainsi que la phylogénie des ARNr, ont convaincu la plupart des scientifiques que la racine de l'arbre de la vie devait se situer entre les *Bacteria* et les *Archaea*. Cependant l'origine des *Archaea* reste encore un vaste sujet de discussion. Par exemple, l'hypothèse selon laquelle LUCA (Last Universal Common Ancestor) était acellulaire repose sur un enracinement entre les *Bacteria* et les *Archaea* (Koonin and Martin, 2005). Mais, d'autres hypothèses suggèrent que la racine de l'arbre de la vie se situe au sein des bactéries et placent les *Archaea* comme un taxon dérivé d'une bactérie gram-positive (Gupta, 1998; Cavalier-Smith, 2006; Lake *et al.*, 2008). Cependant, aucun des scénarii proposés par ces auteurs n'explique de façon convaincante l'origine de la machinerie de réplication de l'ADN partagée entre les *Archaea* et les *Eukaryota* (Valas and Bourne, 2011). Patrick Forterre a proposé que les cellules aient acquis la capacité à répliquer l'ADN à partir des virus. Il postule que cet événement se serait déroulé trois fois, chacun donnant naissance à un domaine de la vie (Forterre, 2006b, a). L'incroyable diversité de la machinerie de réplication de l'ADN au sein de la virosphère supporte cette idée et la plasticité de réplication du monde viral a pu, et peut certainement, conduire à des innovations primordiales dans le monde cellulaire (Valas and Bourne, 2011).

De nouvelles hypothèses sont ainsi régulièrement formulées sur l'origine du domaine des *Archaea*, hypothèses qui entretiennent le débat... Les *Archaea* restent donc encore le plus énigmatique des trois domaines de la vie.

II- *Extension de nos connaissances sur la diversité taxonomique et fonctionnelle du troisième monde : apports de l'écologie moléculaire*

II.1. De 2 à 6 phyla archéens

Les premières études, basées sur la phylogénie de l'ARNr 16S d'un petit nombre d'espèces cultivées, distinguaient deux phyla au sein des *Archaea* : les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota* (Fig. 4, (Woese and Olsen, 1986)). La diversité fonctionnelle de ces organismes, établie sur la base de ces souches, principalement isolées à partir d'environnements extrêmes, apparaissait réduite en comparaison de celle des bactéries (Woese, 1987). Cette image a été considérablement altérée quand les approches génomiques ont été appliquées à l'étude *in situ* des microorganismes. L'apport de séquences environnementales d'ARNr 16S¹ a révélé l'existence de nombreuses lignées n'ayant aucun représentant cultivé au sein des *Euryarchaeota* et des *Crenarchaeota*. Ces données ont également mis en évidence que certaines lignées archéennes n'appartenaient à aucun de ces deux phyla.

L'augmentation du nombre de séquences complètes de génomes d'archées constitue aussi un élément clé dans la compréhension de leur phylogénie (Brochier-Armanet *et al.*, 2011). En effet, l'analyse de ces génomes a permis d'accéder à un important panel de gènes peu soumis aux transferts horizontaux entre espèces et impliqués dans des mécanismes conservés chez l'ensemble des organismes vivants (réplication, transcription, *etc.*). Les analyses phylogénétiques basées sur ces gènes, séparément ou réunis dans une même analyse (concaténation), ont permis d'affiner l'histoire évolutive des archées et de résoudre une partie des relations entre les branches basales du domaine (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006; Brochier-Armanet *et al.*, 2011).

Depuis la première classification des *Archaea* (Woese and Olsen, 1986), 4 phyla ont été proposés sur la base d'analyses de séquences environnementales et de génomes : les *Korarchaeota* (Barns *et al.*, 1996), les *Nanoarchaeota* (Huber *et al.*, 2002), les *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) et les *Aigarchaeota* (Nunoura *et al.*, 2011) (Fig. 4 et 5).

¹ En août 2011, 185000 séquences du gène de l'ARNr 16S **affiliées au domaine Archaea** sont disponibles dans GenBank www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/ et 11000 séquences de plus de 1200 paires de bases répertoriées dans RDP11 <http://rdp.cme.msu.edu/>

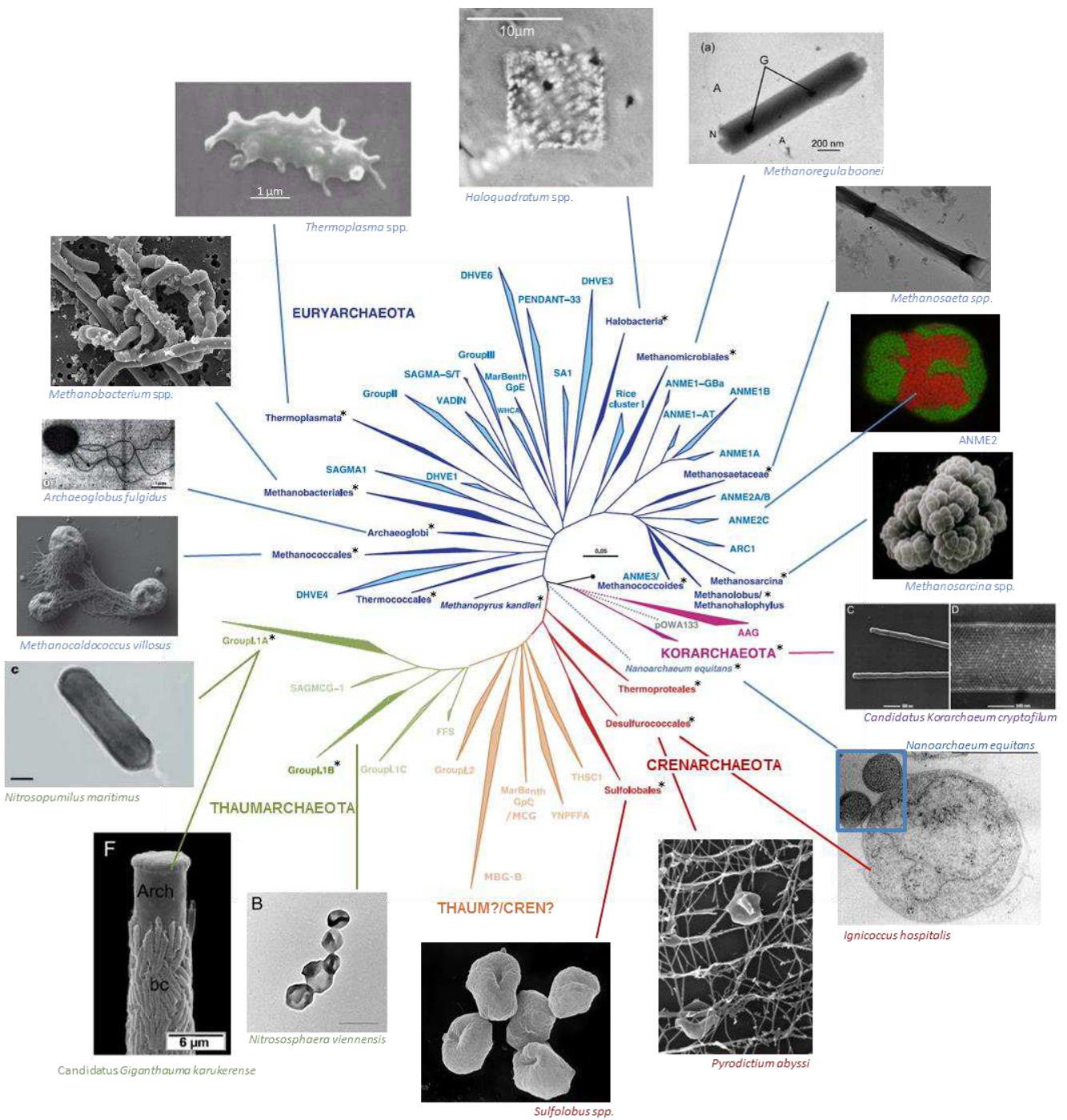


Figure 4 : Diversité morphologique et phylogénie des archaea intégrant les lignées ne contenant pas de représentant cultivé. L'arbre, adapté de Schleper *et al.*, (2005), a été modifié pour indiquer les *Thaumarchaeota* (en vert) et les lignées dont l'affiliation phylogénétique, entre *Crenarchaeota* et *Thaumarchaeota*, est incertaine (en orange) (Pester *et al.*, 2011). La position phylogénétique des *Thaumarchaeota* parmi les *Archaea* est encore incertaine (cf. Figure 5). Les lignées en rouge sont affiliées aux *Crenarchaeota*, les lignées en violet aux *Korarchaeota* et les lignées en bleu aux *Euryarchaeota*. Les lignées foncées dont les noms portent un astérisque contiennent des souches cultivées. La lignée RC-I n'est plus une lignée candidate et correspond au nouvel ordre des *Methanocellales*. Pour chaque lignée, un exemple de morphotype est proposé.

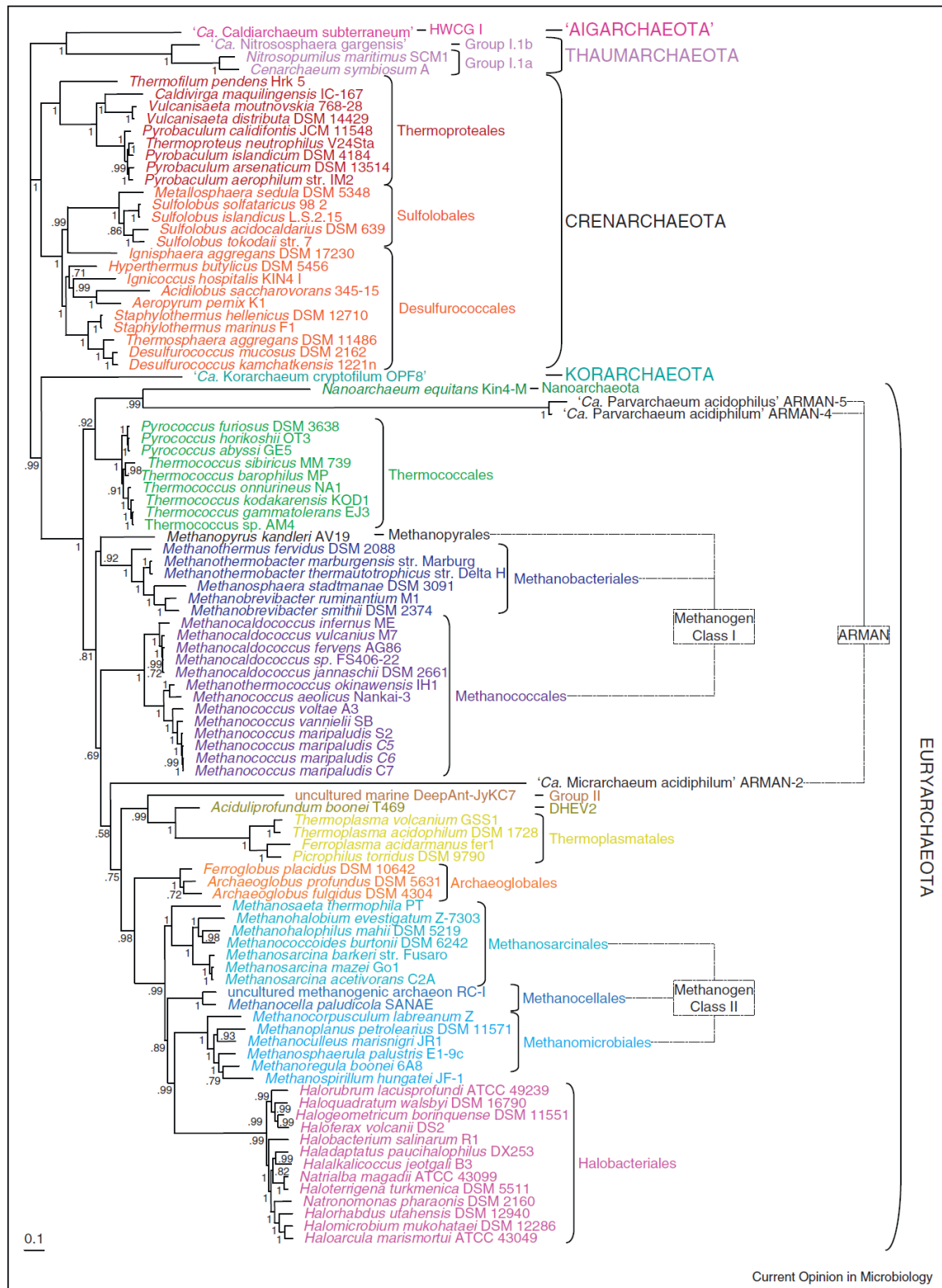


Figure 5 : Arbre non enraciné présentant la phylogénie de 99 archées dont le génome a été séquencé. L'analyse est basée sur la concaténation de 57 protéines ribosomiques présentes dans 89 des 99 génomes séquencés, d'après Brochier-Armanet *et al.*, (2011).

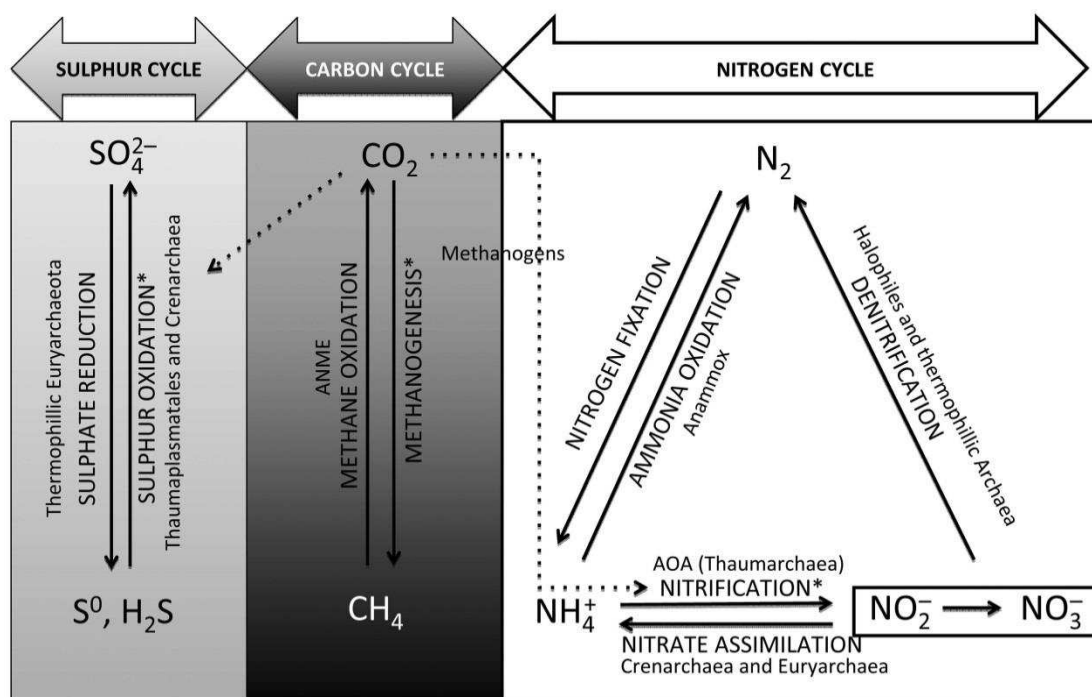


Figure 6 : Illustration du rôle des archées dans les cycles biogéochimiques globaux. La contribution des archées aux cycles globaux est indiquée par le nom des voies métaboliques qu'elles mettent en œuvre et par les lignées d'archées impliquées dans ces voies. Les astérisques indiquent les voies pour lesquelles les archées jouent un rôle majeur, d'après Jarrell *et al.*, (2011).

II.2. Distribution environnementale et écologie des archées

II.2.a. Des organismes cosmopolites, abondants...

Outre l'expansion des connaissances sur la diversité phylogénétique des archées, les approches d'écologie moléculaire ont profondément modifié la perception de la distribution environnementale de ce domaine. En effet, les archées ne se restreignent pas aux environnements extrêmes et/ou anaérobies mais ces organismes ont une répartition cosmopolite, et sont rencontrés dans des milieux modérés² très divers (océans, lacs, sols, *etc.*). Compte tenu de leur distribution environnementale, bien plus large qu'initialement envisagée, une réévaluation de l'importance quantitative des archées a été réalisée depuis le début des années 2000. Ces dernières représentent une composante majeure de la biomasse microbienne dans certains environnements modérés. Elles contribuent ainsi à plus de 20 % de la biomasse microbienne des océans (DeLong and Pace, 2001), et à plus de 30 % de l'abondance procaryotique dans certaines zones de la colonne d'eau oxygénée de lacs d'eau douce (Auguet and Casamayor, 2008; Callieri *et al.*, 2009; Casamayor and Borrego, 2009). Dans les sédiments marins profonds³, 87 % des lipides polaires intacts, marqueurs de la présence de cellules vivantes, sont d'origine archéenne (Lipp *et al.*, 2008). Les archées (méthanogènes et non cultivées) constitueraient donc la majeure partie de la biomasse microbienne de ces environnements qui pourraient eux-mêmes héberger la moitié de la biomasse microbienne de la Terre (Whitman *et al.*, 1998). La large distribution et l'abondance des archées dans les écosystèmes aquatiques et terrestres suggèrent qu'elles contribuent significativement aux cycles énergétiques globaux, en particulier aux cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote (cf. section II.3 de cette partie, Fig. 6).

II.2.b. ... et majoritairement inconnus

A l'échelle globale, la connaissance de leurs implications dans ces cycles demeure cependant très imparfaite. En effet, la moitié des espèces d'archées isolées se développe uniquement en conditions extrêmes et les souches d'archées non extrémophiles disponibles

² Le terme de "modéré" sera utilisé pour qualifier les milieux non géothermaux, hypersalins, acides ou basiques.

³ Supérieur à 1 m de profondeur.

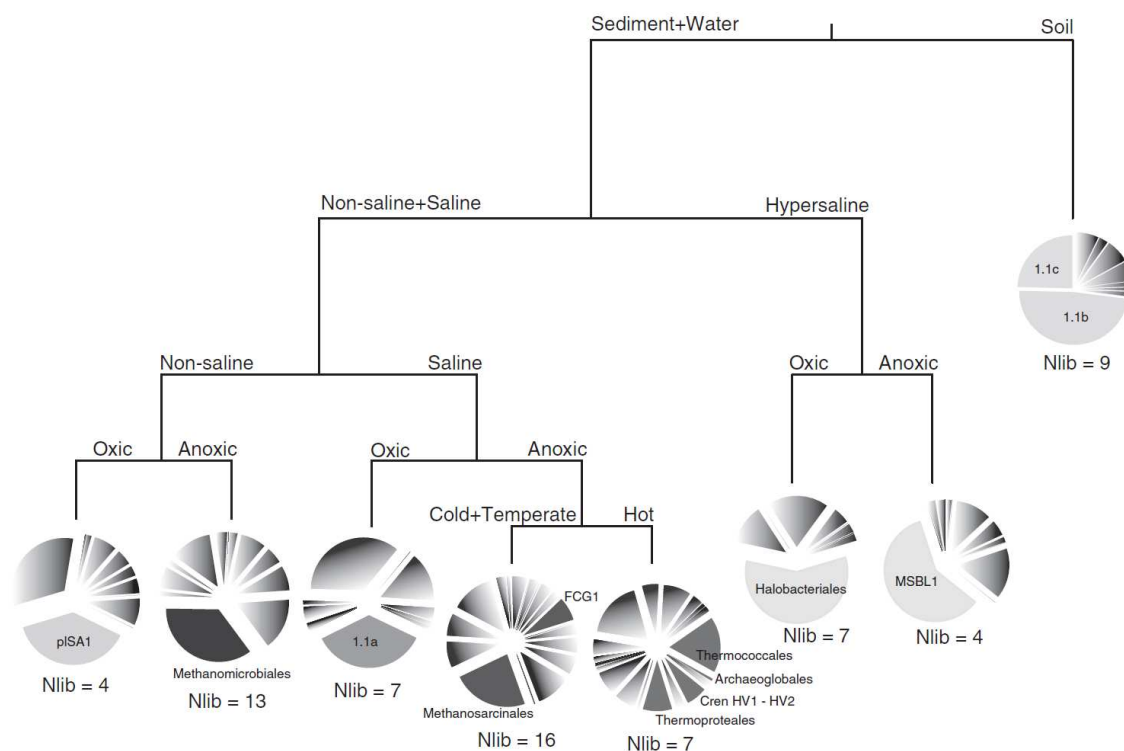


Figure 7 : Régression multivariée entre le nombre de séquences de lignées d'archées et les paramètres environnementaux suivants : habitats (sol, lac, océan, colonne d'eau, sédiment), salinité, concentration en oxygène et température. Le modèle explique 37% de la variance de l'ensemble du jeu de données. Les diagrammes situés à l'extrémité de chaque branche représentent la moyenne normalisée de l'abondance des lignées pour chaque lignée significativement corrélée aux paramètres environnementaux, d'après Auguet *et al.*, (2010).

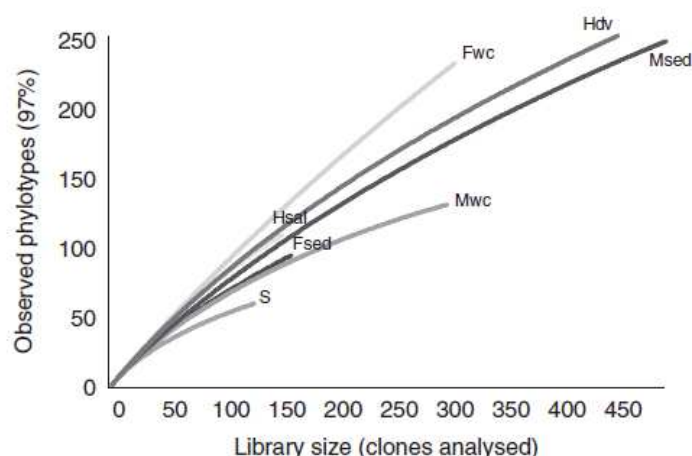


Figure 8 : Courbes de raréfaction illustrant la diversité des *Archaea* dans les habitats suivants : colonnes d'eau dulçaquicoles (Fwc), cheminées hydrothermales (Hdv), sédiments marins (Msed), colonnes d'eau hypersalines (Hsal), sédiments de milieux dulçaquicoles (Fsed), colonnes d'eau de milieux marins (Mwc), sols (S). Le seuil de discrimination des OTUs (Operational Taxonomic Unit) est de 97% de similarité, d'après Auguet *et al.*, (2010).

dans les centres de ressources biologiques se limitent encore aux méthanogènes⁴. Ainsi, en conditions environnementales modérées, la grande majorité des archées a uniquement été mise en évidence par des approches PCR⁵-dépendantes. Ces lignées ne possédant pas de représentant isolées sont qualifiées de candidates. Parmi les 49 lignées d'archées répertoriées par Schleper *et al.*, (2005), 37 ne possèdent aucun représentant cultivé (Fig. 4). Depuis l'étude de Schleper *et al.*, (2005), aucun organisme représentatif de ces nouveaux phyla ou clades n'a été isolé (à l'exception de *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke *et al.*, 2005) et de *Nitrososphaera viennensis* (Tournai *et al.*, 2011) affiliés aux *Thaumarchaeota* (cf. section II.3.e). En conséquence, la détermination des niches écologiques préférentielles, des sources d'énergies, des capacités physiologiques et de l'implication dans les cycles biogéochimiques de ces nouvelles lignées sans représentant cultivé, demeurent très hypothétique et repose principalement sur des hypothèses formulées à partir de leur distribution environnementale. Ces postulats sont rendus complexes car, d'une part, la nomenclature de ces lignées n'est pas clairement définie (certaines lignées changent de nom et/ou portent plusieurs noms (DeSantis *et al.*, 2006; Auguet *et al.*, 2010)). D'autre part, l'étendue phylogénétique de ces lignées n'est pas définie et l'affiliation taxonomique de certaines séquences est variable (suivant les auteurs, une même séquence est affiliée à des lignées voisines).

II.2.c. Facteurs environnementaux influençant la distribution globale des archées

Auguet et collaborateurs (2010) ont établi les facteurs environnementaux déterminant la répartition des archées en utilisant un vaste jeu de séquences d'ARNr 16S d'archées (environ 2000 séquences issues de milieux diversifiés) et en se basant la nomenclature de la base de données Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/>). Ces facteurs sont, dans l'ordre, l'habitat (sol vs. zone benthique ou pélagique des écosystèmes aquatiques), la salinité, la teneur en dioxygène et enfin la température (Fig. 7). Cette étude suggère également que les conditions environnementales prévalant dans les zones pélagiques des milieux d'eau douce favorisent une importante diversité archéenne (Fig. 8).

⁴ Sur les 445 souches d'archées référencées à la DSMZ (**Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (Collection allemande de microorganismes)**, <http://www.dsmz.de>) en 2010, 52% sont des méthanogènes, 23% des halophiles, 23% des thermophiles et 2% des acidophiles (Plasencia *et al.*, 2010).

⁵PCR : Polymerase chain reaction.

Voies cataboliques de l'acétate	Enthalpie libre standard associée aux réactions (par mole d'acétate)
Dénitrification	
$5\text{CH}_3\text{COO}^- + 8\text{NO}_3^- + 13\text{H}^+ \rightarrow 10\text{CO}_2 + 4\text{N}_2 + 14\text{H}_2\text{O}$	$\Delta_r G^\circ = -802 \text{ kJ}$
Réduction d'oxydes de manganèse	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 4\text{MnO}_2 + 2\text{CO}_2 \rightarrow 4\text{MnCO}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$	$\Delta_r G^\circ = -727 \text{ kJ}$
Réduction d'oxydes de fer	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ + 24\text{Fe}(\text{OH})_3 \rightarrow 8\text{Fe}_3\text{O}_4 + 2\text{CO}_2 + 38\text{H}_2\text{O}$	$\Delta_r G^\circ = -717 \text{ kJ}$
Réduction du nitrate	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{NO}_3^- + 3\text{H}^+ \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta_r G^\circ = -505 \text{ kJ}$
Réduction du sulfate	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} + 3\text{H}^+ \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O}$	$\Delta_r G^\circ = -63 \text{ kJ}$
Méthanogenèse acétoclastique	
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	$\Delta_r G^\circ = -36 \text{ kJ}$

Tableau 2 : Voies cataboliques de l'acétate et enthalpie libre standard ($\Delta_r G^\circ$) associée à ces voies. Dans les environnements non-extrêmes, la seule voie catabolique de l'acétate connue pour les archées, la méthanogenèse acétoclastique, est la voie la moins énergétique, d'après Thauer *et al.*, (1989).

II.2.d. Un trait écologique commun unifiant les archées ?

Les archées possèdent des adaptations physiologiques leur permettant de se développer dans des environnements extrêmement variés ; en témoigne leur caractère cosmopolite. Existe-t-il cependant un trait écologique commun aux archées ? Et si oui, quelles perspectives ouvre-t-il sur leurs niches écologiques au sein des environnements non-extrêmes ? Dans un article d'opinion, Valentine (2007) propose un principe écologique unificateur du domaine des *Archaea* qui engage la séparation entre les 2 domaines procaryotes au-delà de leurs différences phylogénétiques, génomiques et structurales. Selon Valentine (2007), les archées se distingueraient des bactéries par leur adaptation au stress énergétique chronique⁶. Cette adaptation reposerait principalement sur la faible perméabilité de leur membrane cytoplasmique (Fig. 3), limitant les pertes d'énergie associées aux entrées passives d'ions et donc à leurs efflux actifs.

- Dans les environnements extrêmes, l'entrée passive d'ions dans la cellule (ions sodium en milieux hypersalins, protons en milieux acides) est accentuée par les forts gradients de concentration entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'énergie nécessaire pour l'efflux actif de ces ions peut constituer un stress énergétique chronique. La faible perméabilité des membranes archéennes limite l'entrée passive de ces ions (Fig. 3) et abaisse donc l'énergie dépensée pour leur efflux. L'avantage énergétique conféré aux archées par cette adaptation expliquerait leur dominance sur les bactéries dans les environnements extrêmes.
- Quel que soit l'environnement, la perméabilité membranaire influence aussi le maintien du gradient ionique mis en place de part et d'autre de la membrane pour générer de l'ATP. La diffusion passive d'ions, n'empruntant pas l'ATP synthétase pour traverser la membrane, constitue une perte énergétique pour la cellule. La faible perméabilité membranaire des archées leur permettrait de conserver efficacement l'énergie et ainsi d'exploiter des niches écologiques "très peu énergétiques" dans des environnements non extrêmes. L'exploitation de ces niches repose sur des métabolismes qui leurs sont propres, tel que la méthanogenèse (Tableau 2) ou sur des métabolismes partagés avec les bactéries, tel que l'oxydation de l'ammonium (Schleper and Nicol, 2010). Valentine (2007) propose l'hypothèse que les archées utilisant des substrats énergétiques communs avec les bactéries seraient avantagées par de faibles concentrations en substrats ou des conditions thermodynamiques défavorables.

⁶ Le stress énergétique intervient lorsque l'énergie disponible pour un organisme est inférieure à l'énergie dont il a besoin pour maintenir sa croissance, son activité ou pour survivre. Le ratio d'énergie requise pour la survie : maintenance : croissance est estimé à 1 : 10³ : 10⁶ (Price and Sowers, 2004).

Il est possible que les archées non cultivées possèdent des caractéristiques membranaires similaires aux archées cultivées et, en conséquence, exploitent des niches écologiques "peu énergétiques" dans les environnements non extrêmes. De plus, d'autres adaptations pourraient être développées par les archées afin d'exploiter les niches écologiques les moins énergétiques. Il a notamment été proposé que les archées des sédiments marins puissent diminuer l'énergie requise pour leur croissance en recyclant les chaînes isopréniques issues de lipides contenus dans la matière organique détritique, au lieu de synthétiser ces chaînes *de novo* (Takano *et al.*, 2010).

II.3. Diversité taxonomique et fonctionnelle au sein des 6 phyla archéens

Dans cette section, seront présentés les différents phyla archéens, et certaines des fonctions métaboliques clés, identifiées ou putatives, accomplies par certains clades, affiliés aux *Euryarchaeota*, aux *Crenarchaeota* et aux *Thaumarchaeota*, au sein de la biosphère. Ne sera présentée qu'une sélection de certaines de leurs contributions métaboliques, principalement celles relevant de leurs implications dans le cycle de l'azote et du carbone dans les environnements mésophiles (Fig. 6). Une brève description de nouvelles lignées archéennes, affiliées aux *Euryarchaeota* et aux *Crenarchaeota*, impliquées ou supposées impliquées dans la production et la consommation de méthane, sera apportée en complément des informations présentées dans la 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique.

II.3.a. Les Euryarchaeota

Initialement, les espèces appartenant au domaine des *Euryarchaeota* étaient divisées en 4 groupes physiologiques et métaboliques, les hyperthermophiles (*Thermococcales*, *Archaeoglobales*, *etc.*), les halophiles (*Halobacteriales*), les acidophiles (*Thermoplasmatales*) et les méthanogènes (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales*, *etc.*). Les données environnementales ont démontré que des représentants de ce phylum étaient également présents dans des environnements mésophiles aérobies (DeLong and Pace, 2001; Barberán *et al.*, 2011) et que sa diversité ne se limitait pas uniquement aux méthanogènes dans les environnement mésophiles anaérobies (Grosskopf *et al.*, 1998; Hinrichs *et al.*, 1999; Vetriani *et al.*, 1999; Teske and Sorensen, 2008).

- Exemples d'implication des *Euryarchaeota* dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote : les méthanogènes et les méthanotrophes anaérobies

-Les Méthanogènes :

Les méthanogènes prospèrent dans les environnements anaérobies riches en matière organique (rumen, sédiments marins ou lacustres, marais, etc.). Il est estimé qu'un milliard de tonnes de méthane sont produites chaque année par les méthanogènes, attestant de leur rôle primordial dans le cycle du carbone (Thauer, 1998). L'impact écologique de ce groupe métabolique est fondamental. Les traits physiologiques, la signification écologique et leurs rôles au sein des réseaux trophiques anaérobies seront abordés dans la 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique.

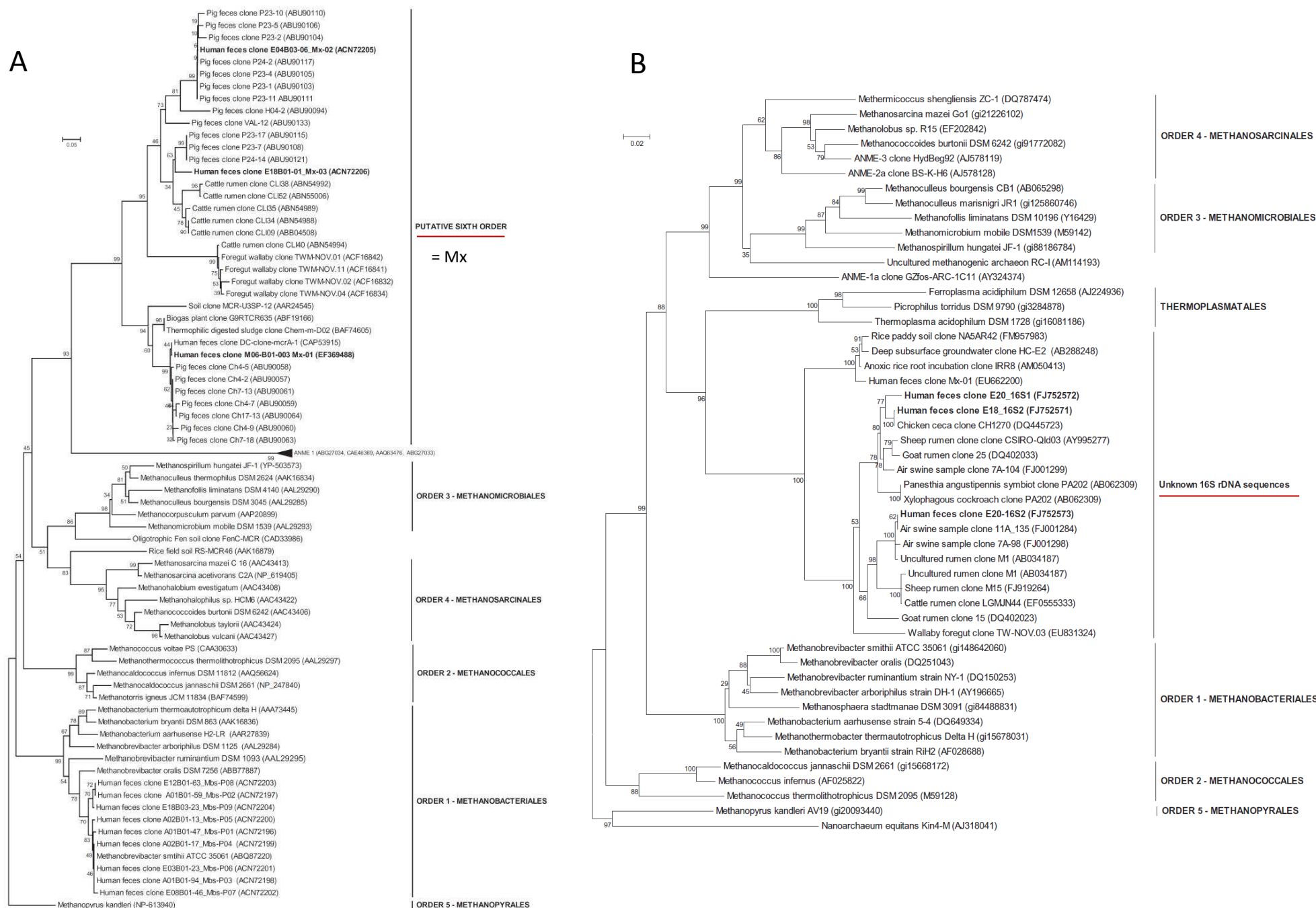
A l'heure actuelle, les méthanogènes représentent les seules *Euryarchaeota* cultivées à partir d'environnements non extrêmes. Elles constituent le groupe le plus vaste des *Euryarchaeota* et comprennent 6 ordres (*Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales*, *Methanocellales*). Il a été suggéré que la méthanogenèse serait apparue une seule fois, au début de l'histoire évolutive des *Euryarchaeota*, mais après la divergence des *Thermococcales* (Baptiste *et al.*, 2005; Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006). Dans ce cas, elle aurait été perdue au moins 3 fois par la suite, chez les *Thermoplasmatales*, les *Archaeoglobales* et les *Halobacteriales* (Gribaldo and Brochier-Armanet, 2006).

L'existence de deux nouveaux ordres de méthanogènes a été proposée sur la base de séquences environnementales : les clades MSBL1⁷ (van der Wielen *et al.*, 2005) et Mx⁸ (Mihajlovski *et al.*, 2008; Mihajlovski *et al.*, 2010) :

- Le clade MSBL1 est rencontré dans des milieux hypersalins (Auguet *et al.*, 2010). Son activité méthanogène reste hypothétique et a été suggérée compte tenu de sa dominance dans ces milieux où des concentrations en méthane et des activités de méthanogenèse importantes ont été mesurées (van der Wielen *et al.*, 2005; Borin *et al.*, 2009). En supposant que MSBL1 soit un nouvel ordre de méthanogènes, ses représentants utilisent probablement la voie méthylotrophe (cf. 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique) qui est la seule voie de méthanogenèse connue pour être fonctionnelle à des concentrations en sel supérieures à 15% (Oren, 2011).

⁷MSBL1 : Mediterranean Sea Brine Lakes group 1.

⁸Mx : nom tiré des clones de Mihajlovski *et al.*, (2008; 2010).



- Le clade Mx (Fig. 9), principalement détecté dans des écosystèmes digestifs mais également dans des sols et des tourbières, a été identifié en accord avec la phylogénie du gène *mcrA* codant pour la Méthyl CoM reductase, l'enzyme clé de la méthanogenèse (Cf. 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique). Cependant, il a été proposé que les membres de ce clade puissent réaliser un processus d'oxydation anaérobie du méthane en raison d'une proximité phylogénétique marquée entre les séquences *mcrA* de ce clade et celles du groupe ANME⁹-1 (Mihajlovski *et al.*, 2010).

Les archées méthanogènes influent significativement sur le cycle du carbone (Cf. 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique) de par leur catabolisme particulier. Elles jouent aussi un rôle dans la transformation du carbone et de l'azote inorganique. En effet, 4 des 6 ordres de méthanogènes (les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanomicrobiales* et les *Methanosarcinales*) ont la capacité de fixer l'azote atmosphérique (Fig. 6, (Leigh, 2005)) et la moitié des espèces de méthanogènes décrites sont capables de fixer le CO₂ (Hedderich and Whitman, 2006).

-Les Méthanotrophes anaérobies : Différentes lignées d'*Euryarchaeota* (ANME-1, ANME-2, ANME-3), encore non isolées, ont été détectées dans la partie supérieure des sédiments marins en relation avec des réservoirs profonds de méthane (Hinrichs *et al.*, 1999; Knittel and Boetius, 2009). D'autres lignées sont souvent associées aux zones d'oxydation anaérobie du méthane et sont suspectées d'être impliquées dans ce processus, comme par exemple les clades MBG-D¹⁰ (Inagaki *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2011; Webster *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011) et AAA¹¹ (principalement en milieu lacustre, voir 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009; Knittel and Boetius, 2009; Schubert *et al.*, 2011)). Plus récemment, la capacité des méthanotrophes anaérobies du groupe ANME-2 à fixer l'azote atmosphérique a également été mise en évidence (Fig. 10, (Dekas *et al.*, 2009)).

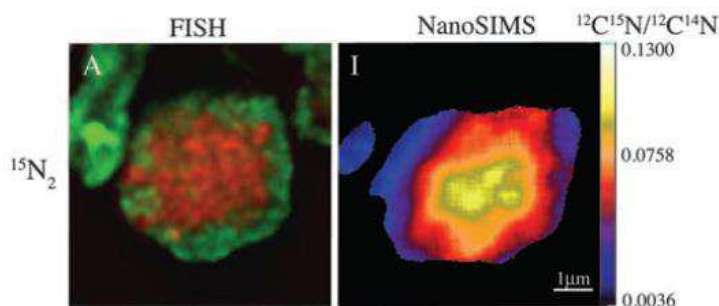


Figure 10 : Fixation du N₂ (marqué au ¹⁵N) au sein d'un consortium entre ANME-2 (en rouge sur la photo de gauche) et bactéries sulfato-réductrices (*Desulfosarcina*, en vert sur la photo de gauche). Les couleurs claires sur la photo de droite (obtenue en microscopie ionique) correspondent à un ratio ¹⁵N/¹⁴N élevé indiquant la fixation de l'azote. La co-localisation d'un ratio ¹⁵N/¹⁴N élevé et des ANME montre que ces organismes sont capables de fixer l'azote atmosphérique, d'après Dekas *et al.*, (2009).

⁹ANME : ANaerobicMEthanotrophs.

¹⁰MBG-D : Marine Benthic Group D.

¹¹AAA : AOM-Associated Archaea.

II.3.b. Les Crenarchaeota

A l'origine, le domaine des *Crenarchaeota* regroupait les hyperthermophiles et les thermoacidophiles (comme les genres *Sulfolobus*, *Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Thermoproteus*, *Thermophilum*). Comme pour les *Euryarchaeota*, les données environnementales ont fortement altéré l'étiquette "d'extrêmophile" attribuée à ce phylum. Jusqu'à récemment, ces données suggéraient que ce groupe avait une large distribution et une importance considérable dans le fonctionnement de la biosphère, en particulier dans le cycle de l'azote. Cependant, les récentes études sur la phylogénie du domaine des *Archaea* ont révélé qu'une grande partie des lignées de *Crenarchaeota* détectées dans des environnements aux conditions environnementales modérées (généralement désignées par les termes "low temperature marine crenarchaeota") constituait un phylum à part entière : les *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008). L'affiliation de certaines lignées aux *Thaumarchaeota* ou aux *Crenarchaeota* demeure cependant encore incertaine (Pester *et al.*, 2011).

- Implication possible des *Crenarchaeota* dans le cycle biogéochimique du méthane : exemples des clades MBG-B et MCG¹²

La capacité des archées à oxyder le méthane en anaérobiose ne semble pas restreinte au seul phylum des *Euryarchaeota*. C'est notamment le cas des clades MBG-B et MCG (Fig. 4). Des analyses de la composition en lipides polaires intacts et des séquences ARNr 16S ont révélé la dominance de ces groupes, métaboliquement actifs, au sein de la communauté microbienne de plusieurs zones de gradients opposés de méthane et de sulfate dans les sédiments marins¹³ (Biddle *et al.*, 2006; Inagaki *et al.*, 2006; Sørensen and Teske, 2006). Cependant, les signatures isotopiques de leurs biomarqueurs lipidiques sont plus proches de celle du carbone organique détritique que du méthane. Il a donc été suggéré que, contrairement aux ANME, ces lignées pourraient oxyder le méthane sans l'assimiler, et utiliseraient le carbone organique détritique comme source de carbone (Biddle *et al.*, 2006). L'oxydation du méthane leur servirait donc uniquement de source d'énergie. Il est néanmoins possible que les membres des groupes MBG-B et MCG assimilent le méthane dans d'autres constituants cellulaires et recyclent des lipides intacts contenus dans de la matière organique détritique (Takano *et al.*, 2010).

¹²L'affiliation de ces 2 lignées aux *Crenarchaeota* ou aux *Thaumarchaeota* n'est pas encore clairement déterminée (Pester *et al.*, 2011). MBG-B : Marine Benthic Group-B, noté MarBenthGpB dans la figure 4.

¹³ Zones d'oxydation anaérobiose du méthane (Cf. 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique).

II.3.c. Les Korarchaeota

Ce phylum a été proposé sur la base d'une divergence importante entre des séquences ARNr 16S d'archées, issues de sources chaudes (~ 85°C) du Yellowstone National Park et les phyla des *Crenarchaeota* et des *Euryarchaeota* (Barns *et al.*, 1994; Barns *et al.*, 1996). Le séquençage complet du génome de l'espèce "*Candidatus* Korarchaeum cryptophilum", issue d'une culture d'enrichissement, soutient la validité de ce phylum et suggère que cette espèce présente un métabolisme strictement anaérobie et chimio-organo-hétérotrophe basé sur l'utilisation de peptides comme principale source de carbone et d'énergie (Elkins *et al.*, 2008).

II.3.d. Les Nanoarchaeota

Ce phylum est représenté par l'espèce "*Candidatus* Nanoarchaeum equitans" (Huber *et al.*, 2002). Cet organisme hyperthermophile ne se développe qu'en présence d'*Ignicoccus hospitalis* (affilié aux *Crenarchaeota*). "*Ca. N. equitans*" détient le record de la plus petite espèce cultivée (diamètre < 400 nm) et possède un génome extrêmement réduit (0,49 Mb) qui suggère une dépendance métabolique à *Ignicoccus* spp. Cependant, la nature de la relation, symbiotique ou parasitique, entre "*Ca. N. equitans*" et *Ignicoccus* spp. n'a pas encore été déterminée (Huber *et al.*, 2003). L'évolution rapide du génome de "*Ca. N. equitans*", typique des génomes ayant subi une réduction, pourrait expliquer sa distance phylogénétique aux autres phyla archéens et il a été proposé que cette lignée dériverait des *Euryarchaeota* (Brochier *et al.*, 2005).

II.3.e. Les Thaumarchaeota

Ce phylum a été proposé à partir d'analyses de génomique comparative et phylogénétiques basées sur la concaténation des gènes ARNr 16S et 23S et de 53 gènes codant pour des protéines ribosomiques (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Spang *et al.*, 2010). Ce phylum inclut les espèces *Nitrosopumilus maritimus*, *Nitrososphaera viennensis*, "*Candidatus* Cenarchaeum symbiosum", "*Candidatus* Nitrosocaldus yellowstonii" et "*Candidatus* Nitrososphaera gargensis", ainsi que de nombreuses séquences environnementales (identifiées sous le terme de Marine Group I, MGI (Teske and Sorensen, 2008)), issues de milieux aérobies modérés, qui avaient été précédemment affiliées aux *Crenarchaeota*. Ce phylum regroupe des organismes non extrêmophiles réalisant la première étape de la nitrification : l'oxydation de l'ammonium. Il est cependant possible que

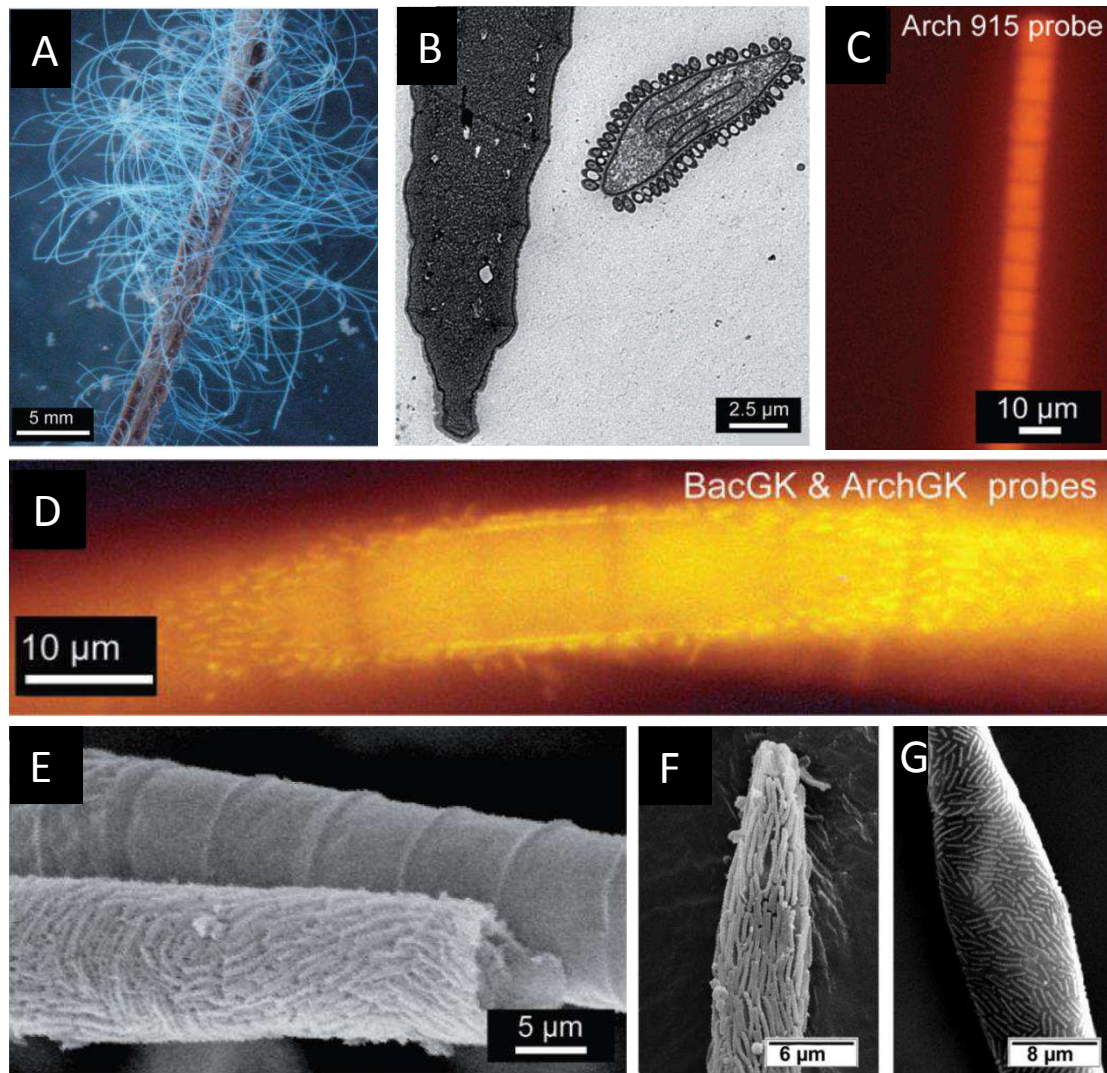


Figure 11 : Analyse ultrastructurale, optique et hybridation fluorescente *in-situ* de Candidatus *Giganthauma karukerense* et Candidatus *Giganthauma insulaporcus*, d'après Muller *et al.*, (2010).

- A. Observation en microscopie optique de filaments de Candidatus *G. karukerense* / *G.insulaporcus* sur des bois coulés de mangrove.
- B. Observation en microscopie électronique à transmission d'une section transversale de Candidatus *G. insulaporcus* et Candidatus *G. karukerense*.
- C. Hybridation positive de Candidatus *G. insulaporcus* avec la sonde Arch 915.
- D. Double hybridation montrant Candidatus *G. karukerense* (marqué avec la sonde archGK) et son potentiel ecto-symbionte bactérien (marqué avec la sonde bacGK).
- E. Observation en microscopie électronique à balayage de Candidatus *G. karukerense* et *G.insulaporcus*.
- F. et G. Variations de la densité et du nombre d'ecto-symbiontes bactériens (potentiellement thio-autotrophes).

ce métabolisme ne soit pas partagé par tous les représentants des *Thaumarchaeota* puisque le gène *amoA*, codant pour l'ammonium monooxygénase, n'a pas été détecté chez "*Candidatus* Giganthauma karukerense" et "*Candidatus* Giganthauma insulaporcus" (Fig. 11, (Muller *et al.*, 2010)). L'analyse du génome de *Nitrosopumilus maritimus* (Könneke *et al.*, 2005) et des études environnementales (Ingalls *et al.*, 2006) suggèrent des types trophiques variés pour les membres de ce phylum (auto-, mixo- et hétéro-trophie).

▪ Implication des *Thaumarchaeota* dans le cycle biogéochimique de l'azote

Des membres des *Thaumarchaeota* jouent un rôle important dans le cycle biogéochimique de l'azote dans les sols (Leininger *et al.*, 2006), les océans (Wuchter *et al.*, 2006), et les lacs (Llirós *et al.*, 2010). En effet, ces microorganismes réalisent l'oxydation de l'ammonium, une fonction métabolique qui était, jusqu'à récemment, considérée comme l'apanage des bactéries (Treusch *et al.*, 2005). L'importance relative de la contribution des bactéries et des archées à l'oxydation de l'ammonium au sein des écosystèmes pourrait varier en fonction de gradients environnementaux définissant des niches écologiques préférentielles pour ces 2 domaines. Ainsi, *Nitrosopumilus maritimus* et "*Candidatus* Nitrososphaera gargensis" sont capables de se développer à des concentrations en ammonium beaucoup plus faibles que leurs homologues bactériens (Martens-Habben *et al.*, 2009). Une étude récente suggère que les archées oxydant l'ammonium présenteraient également une meilleure affinité pour l'oxygène (Park *et al.*, 2010). De nombreux environnements étant caractérisés par de faibles concentrations en ammonium (milieux pélagiques oligotrophes) ou en oxygène (sédiments ou oxycline de milieux pélagiques), les archées pourraient jouer un rôle primordial dans le processus d'oxydation de l'ammonium au sein de la biosphère. Il est intéressant de constater que ces observations étayent l'hypothèse formulée par Valentine (2007) sur l'adaptation des archées au stress énergétique.

II.3.f. Les Aigarchaeota

Ce phylum a été récemment proposé sur la base de l'analyse d'un génome composite, attribué à l'espèce "*Candidatus* Caldiarchaeum subterraneum", à partir d'une étude de métagénomique menée sur un tapis microbien d'une source géothermale profonde (Nunoura *et al.*, 2011). L'étude de ce génome suggère que cet organisme pourrait être chimio-lithotrophe et utiliser le H₂ ou le CO pour réduire l'oxygène, le nitrate ou le nitrite. La validité de ce nouveau phylum et son rattachement possible aux *Thaumarchaeota* ou aux *Crenarchaeota* sont cependant encore discutés (Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Pester *et al.*, 2011).

2nde Partie : Les virus d'archées, intrigants, diversifiés et... encore peu connus

Les archées, comme tous les organismes vivants, sont soumis, au sein des écosystèmes, à de nombreux facteurs de régulation, qu'ils soient descendants ou ascendants (régulation « *Top-Down* » et « *Bottom-up* »). Dans ce chapitre, seront présentés les virus d'archées dont la diversité morphotypique et génotypique est surprenante mais dont le rôle écologique sur le contrôle des communautés archéennes reste encore très imparfaitement connu, particulièrement dans les environnements « non extrêmes ». Pourtant, les archées jouent des rôles essentiels dans ces environnements et au sein de la biosphère, réalisant des fonctions métaboliques clés et uniques, notamment dans la production et la consommation de méthane dans les écosystèmes anoxiques (Cf. 1^{ère} et 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique). Comprendre et quantifier l'impact des virus sur les communautés d'archées, en particulier sur les microorganismes méthanogènes et/ou méthanotrophes, apparaît être un défis majeurs en écologie.

Dans cette partie, un bref rappel sur le cycle de vie des virus et sur les principaux rôles, identifiés à ce jour, qu'ils accomplissent au sein des écosystèmes sera proposé puis un état de l'art sur les virus d'archées sera établi.

I- Les "cycles de vie" des virus

Les virus¹⁴ sont les entités biologiques les plus abondantes de la planète ($\sim 10^{31}$ particules virales (Rohwer and Edwards, 2002), et constituent le plus grand réservoir de diversité génétique non caractérisée (Suttle, 2007). Présents dans tous les biotopes, les virus sont potentiellement capables d'infecter toutes les cellules vivantes, certains étant même capables d'infecter d'autres virus (La Scola *et al.*, 2008). Les virus ne sont pas autonomes et sont obligés de détourner la machinerie cellulaire d'un hôte afin de se multiplier. Quatre principaux "cycles de vie" viraux ont été décrits (Weinbauer, 2004) ; tous débutent par l'adsorption du virus et par l'injection de son matériel génétique dans la cellule hôte (Fig. 12).

¹⁴ Le terme de phage est aussi couramment utilisé pour parler des virus de procaryotes.

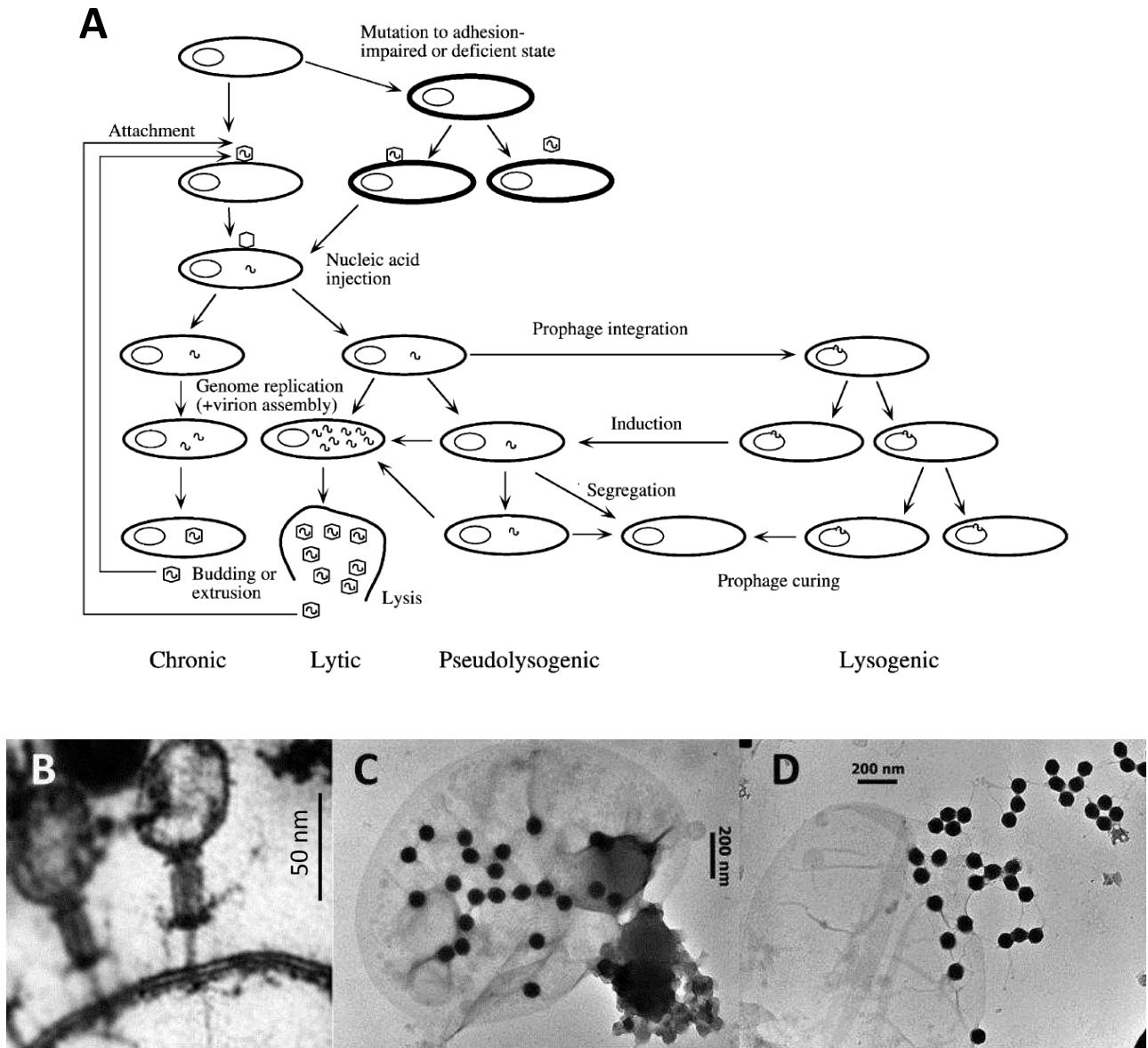


Figure 12 : (A) Les différents types de cycles de vie des virus. (B) Attachement d'un virus à une cellule hôte et injection du matériel génétique. (C) multiplication des virus dans la cellule. (D) libération des virus lors du cycle lytique. (A) D'après Weinbauer (2004), (C-D) photos J. Colombet.

I.1. Les cycles lytiques et lysogéniques (Fig. 12)

En raison de l'existence de méthodologies permettant d'estimer leur importance *in situ*, ces cycles sont les plus étudiés dans l'environnement. Sur des modèles hôte-virus cultivés, ces cycles ont principalement été mis en évidence chez les bactériophages (virus de bactéries).

- Le cycle lytique. Le virus détourne le métabolisme de la cellule hôte pour multiplier son génome et synthétiser de nouveaux composants de structures qui s'auto-assemblent. Les génomes des nouveaux virus sont encapsidés et la cellule hôte est lysée libérant les virus dans l'environnement.
- Le cycle lysogénique. Les virus lysogéniques, aussi appelés virus tempérés, intègrent leur génome à celui de la cellule hôte. Le provirus¹⁵ est dupliqué en même temps que le génome de la cellule hôte, et peut se transmettre sur de multiples générations. Il reste inactif jusqu'à ce qu'un facteur d'induction (généralement un stress) le réactive, causant l'amorçage d'un cycle lytique. Le cycle lysogénique peut constituer un refuge lorsque les cellules hôtes sont en faibles densités et que leur activité métabolique est réduite. Cependant lorsque la survie de l'hôte est compromise, le virus "s'en échappe" en activant le cycle lytique¹⁶ (Ramirez and Villaverde, 1997; Maurice *et al.*, 2010).

I.2. Les cycles chroniques et pseudolysogéniques (Fig. 12)

Les cycles chroniques et pseudolysogéniques ont été décrits à partir de couple hôte-virus isolés (Xiang *et al.*, 2005; Bath *et al.*, 2006) ou d'incubation en microcosmes (Ripp and Miller, 1997), et une seule étude a rapporté une possible infection chronique dans une communauté environnementale (Hofer and Sommaruga, 2001). L'importance de ces cycles dans le fonctionnement des écosystèmes est encore très énigmatique, car peu de méthodologies permettent de les étudier. En culture, ces cycles se caractérisent par une "infection persistante" dans laquelle les virus sont constamment produits sans que la population hôte ne soit complètement lysée.

Lors du cycle chronique, les virus néoformés sont libérés de la cellule hôte sans entraîner la lyse. Le cycle pseudolysogénique ne conduit pas à l'intégration du génome viral dans le génome de l'hôte, mais le virus reste en état de latence dans le cytoplasme. La pseudolysogénie consiste en une multiplication virale n'affectant qu'une partie de la

¹⁵ Génome de virus intégré dans le génome d'une cellule hôte.

¹⁶ Stratégie qualifiée de "*abandoning the sinking ship*" (abandonner le navire en perdition).

population, en raison, par exemple, d'une capacité d'infection réduite. Il est donc possible que ce cycle soit lié à des phages lytiques ou lysogéniques n'ayant pu accomplir leur cycle initial.

II- Bref état de l'art sur les rôles des virus dans l'environnement : exemples dans les systèmes aquatiques

Dans cette section, une brève synthèse des principaux rôles et de l'impact potentiel ou avéré des virus sur le contrôle des communautés microbiennes aquatiques et sur les cycles biogéochimiques est proposée.

II.1. Rôles identifiés des virus dans les écosystèmes aquatiques aérobies et mésophiles

Bien que la découverte des bactériophages remonte au début du siècle dernier (Twort, 1915; d'Herelle, 1917), l'importance et l'implication des virus dans le fonctionnement des écosystèmes n'ont réellement été établies qu'à la fin des années 80. Les premières études conduites sur les milieux aquatiques ont révélé que l'abondance virale (10^6 à 10^8 particules virales.ml⁻¹ (Bergh *et al.*, 1989)), dépassait d'au moins un ordre de magnitude celle des procaryotes suggérant qu'ils étaient des agents clés du fonctionnement des écosystèmes.

II.1.a. Les virus : agents clés des cycles biogéochimiques.

En milieu aquatique les virus seraient responsables, en moyenne, de 10 à 20 % de la mortalité des procaryotes et jusqu'à 100 % dans certains cas (Wommack and Colwell, 2000; Weinbauer, 2004). Par leur implication dans la mortalité microbienne, les virus jouent un rôle primordial dans les cycles du carbone et des nutriments (Fuhrman, 1999; Wilhelm and Suttle, 1999). En effet, la lyse virale de microorganismes autotrophes et hétérotrophes engendre une libération importante de carbone et de nutriments qui augmente la respiration microbienne globale et la libération de CO₂ associée. De plus, la lyse virale court-circuite (*viral shunt*) la boucle microbienne (Fig. 13), limitant les transferts de matière et d'énergie depuis les microorganismes vers les niveaux trophiques supérieurs (Fig. 14).

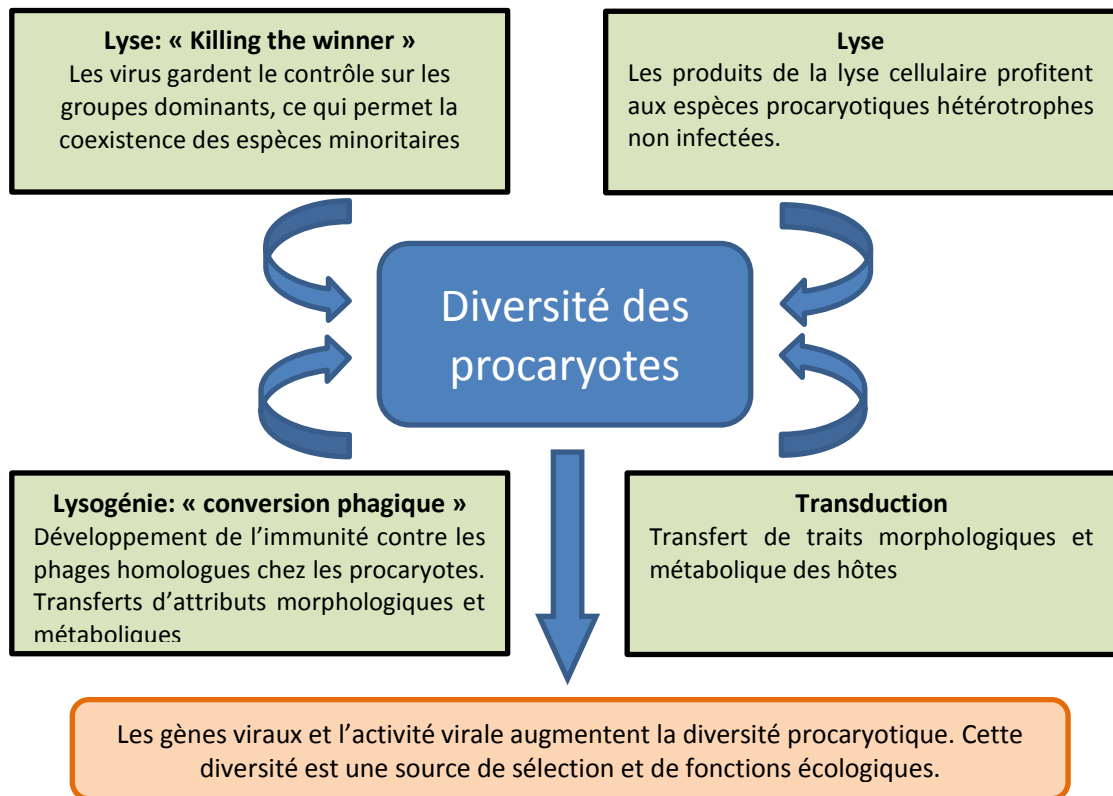


Figure 15 : Schéma conceptuel résumant les actions potentielles des virus sur la diversité des procaryotes, d'après Weinbauer et Rassoulzadegan (2004), repris dans Berdjeb et Jacquet (2009).

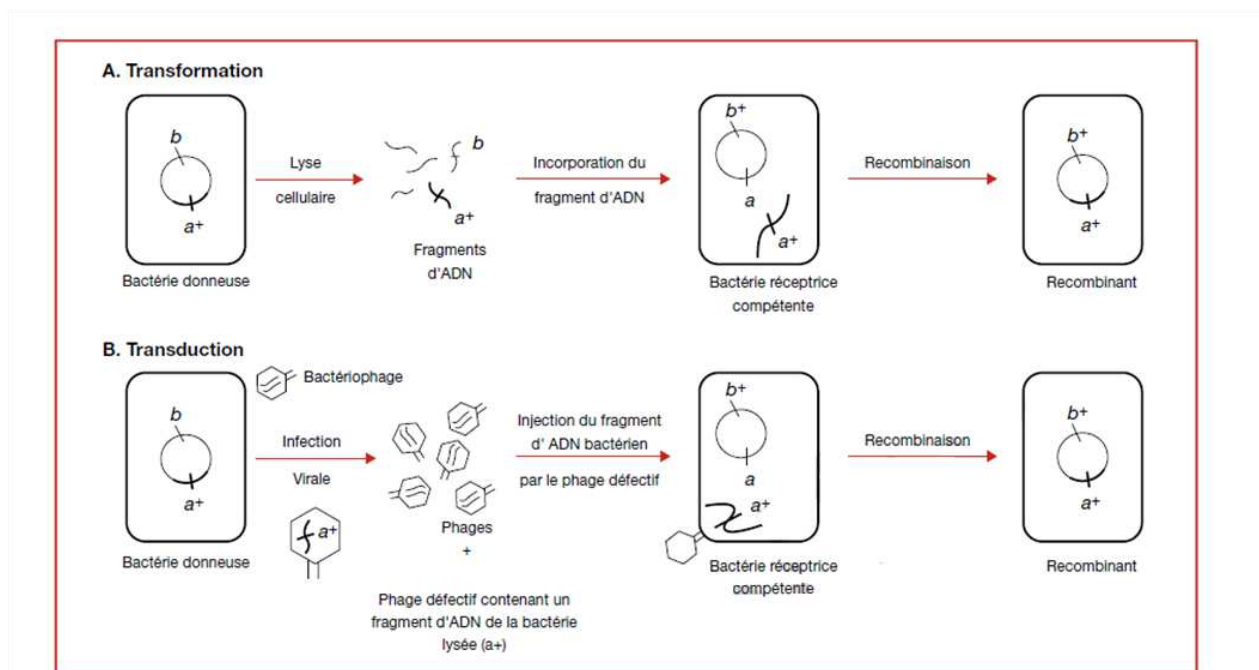


Figure 16 : Transfert génétique horizontal (transformation (A) et transduction (B)) chez les bactéries via l'infection et la lyse virale, d'après Port (2008), repris dans Berdjeb et Jacquet (2009).

II.1.b. Les virus : agents clés de la diversité microbienne (Fig. 15)

Les abondances virales et les taux de cellules procaryotes infectées dans les systèmes aquatiques ont suggéré que les virus influençaient la diversité microbienne spécifique de ces milieux (Fuhrman and Suttle, 1993; Thingstad *et al.*, 1993; Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004). La théorie du "*phage kill the winner*", modélisée par Thingstad & Lignell (1997) et Thingstad (2000), décrit un des effets potentiels des virus sur la diversité microbienne.

Cette théorie repose sur l'hypothèse que les virus présents dans l'environnement ont une forte spécificité pour leur hôte (hypothèse soutenue par la relation spécifique des virus isolés pour une espèce ou une souche hôte (Ackermann and DuBow, 1987; Wommack and Colwell, 2000)). En raison de cette spécificité, la probabilité d'infection des différentes populations procaryotes est densité-dépendante : lorsque l'abondance d'une population augmente elle est plus fortement régulée par les virus. En contrôlant les espèces microbiennes les plus compétitives, les virus permettraient la coexistence d'espèces moins compétitives et contribueraient ainsi au maintien et à la dynamique de la diversité microbienne. De plus, la lyse virale de ces espèces dominantes libère des nutriments pouvant favoriser des populations microbiennes minoritaires non infectées (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004).

II.1.c. Les virus : agents clés dans les transferts de matériel génétique (Fig. 15)

Les virus participent également à accroître la diversité des communautés procaryotes par le transfert direct (transduction) ou indirect (transformation) de gènes d'une cellule infectée vers d'autres cellules (Fig. 16). En effet, l'ADN libéré par la lyse virale vient enrichir le pool d'ADN libre (Jiang and Paul, 1995) qui peut être transformé dans de nouvelles cellules et être intégré au sein de leur génome. Lors d'une infection, de l'ADN de l'hôte peut également être encapsulé dans des virus néoformés qui pourront le transmettre (transduction) en infectant de nouvelles cellules. Les virus lysogéniques peuvent ainsi modifier les capacités physiologiques et métaboliques (« *fitness* ») des cellules qu'ils infectent en intégrant des gènes métaboliques dans leur génome (Edlin *et al.*, 1975; Lin *et al.*, 1977). Ce type de transfert de gènes pourrait influencer la composition de la communauté en permettant aux cellules infectées d'acquérir de nouvelles potentialités, de survivre, voire de dominer la communauté globale (Weinbauer and Rassoulzadegan, 2004).

II.2. Rôles des virus dans d'autres écosystèmes

Les grandes fonctions des virus dans les cycles biogéochimiques et dans la diversité microbienne ont été principalement établies au niveau du pelagos aérobie, pour la communauté procaryote totale. Il est probable qu'une partie de ces fonctions soient "transposables" à d'autres environnements où les abondances virales sont importantes, tels que les milieux extrêmes, les milieux anoxiques, les sédiments ou les sols. Cependant les informations sur l'écologie virale dans ces environnements sont encore peu nombreuses et suggèrent que les relations virus-hôtes pourraient être différentes de celles prévalant dans les milieux pélagiques aérobies. Par exemple, en dépit des fortes concentrations virales mesurées dans les milieux benthiques et extrêmes, la fraction de cellules visiblement infectées est très faible (voire nulle) (Filippini *et al.*, 2006; Danovaro *et al.*, 2008b; Bettarel *et al.*, 2011). Ce "paradoxe d'infectivité" pose la question du type d'interactions établies entre les virus et les procaryotes, mais aussi de l'importance des virus sur la mortalité des procaryotes et sur les cycles biogéochimiques dans ces environnements.

III- Les virus d'archées

Les connaissances sur la diversité phénotypique et génomique des virus d'archées restent encore largement dépendantes des couples hôte-virus isolés, et se limitent essentiellement aux environnements extrêmes. Bien que les archées représentent une fraction importante de l'abondance procaryotique de milieux pélagiques ou benthiques anaérobies, les interactions qu'elles établissent avec les virus dans ces environnements sont encore inconnues.

III.1. Une diversité virale archéenne remarquable, atypique et spécifique

Bien que les premiers virus d'archées aient été isolés dans les années 70 (Torsvik and Dundas, 1974; Wais *et al.*, 1975), leur étude est restée limitée jusqu'au début des années 2000. A ce jour, 42 espèces de virus d'archées ont été décrites (Pina *et al.*, 2011). La plupart des virus isolés proviennent d'environnements hypersalins ou géothermaux où les archées dominent la communauté microbienne (Pina *et al.*, 2011). A la différence de la plupart des bactériophages isolés à ce jour, la majorité des virus d'archées entretient une infection persistante (chronique) avec leurs hôtes (Pina *et al.*, 2011).

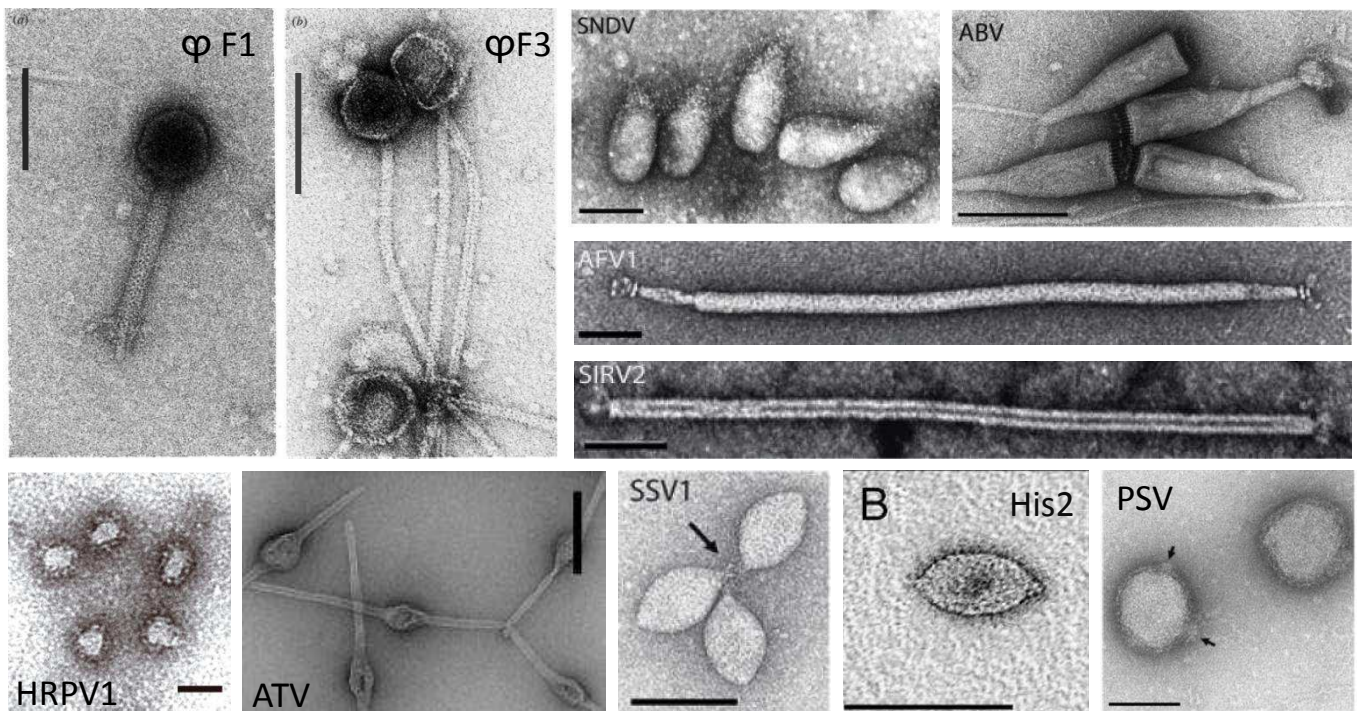


Figure 17 : Variabilité morphotypique des virus d'archées isolés. (les barres d'échelle représentent 100 nm). Familles/genres des virus ϕF1: Myoviridae, ϕF3: Siphoviridae (Nolling *et al.*, 1993), SNDV: Guttaviridae (Arnold *et al.*, 2000), ABV: Ampullaviridae (Haring *et al.*, 2005), AFV1: Lipothrixviridae (Bettstetter *et al.*, 2003), SIRV2: Rudiviridae (Arnold *et al.*, 2000), HRPV1: famille non définie (Pietilla *et al.*, 2009), ATV: Bicaudaviridae (Haring *et al.*, 2005b), SSV1: Fuselloviridae (Palm *et al.*, 1991), His2: Salterprovirus (Bath *et al.*, 2006), PSV: Globuloviridae (Haring *et al.*, 2004).

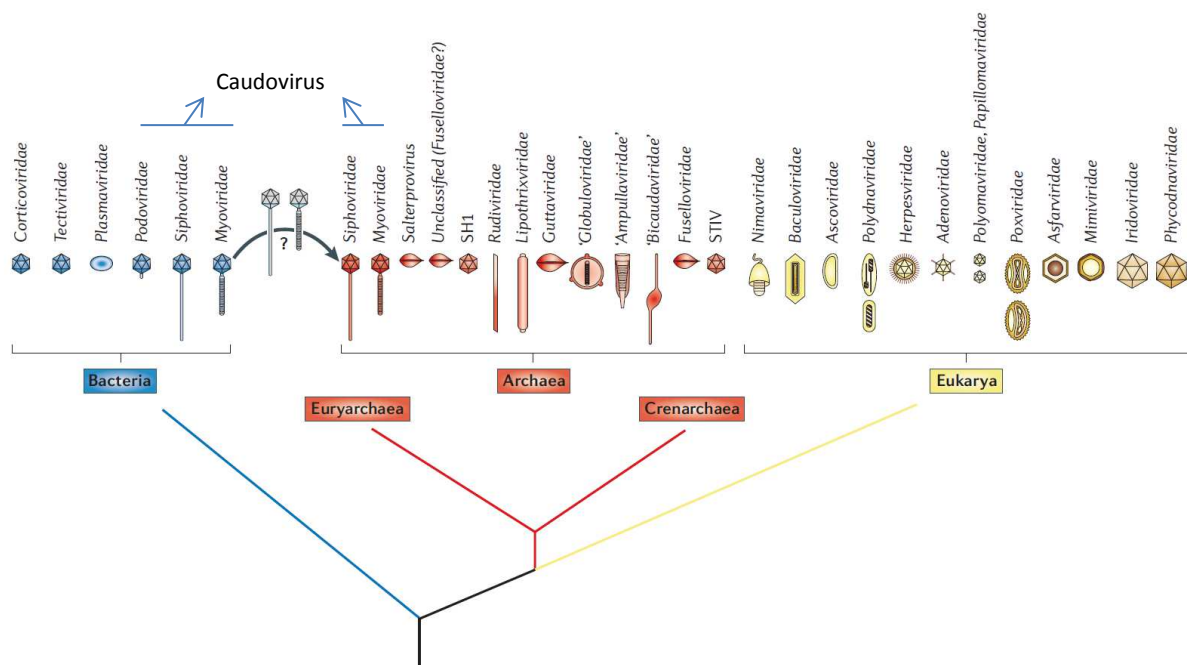


Figure 18 : Répartition des familles virales entre les 3 domaines du vivant. Les familles de virus listées sont approuvées par le Comité International sur la Taxonomie des Virus, à l'exception de celles entre guillemets pour lesquelles les noms sont proposés mais non encore approuvés, d'après Prangishvili *et al.*, (2006a).

Les virions¹⁷ des virus d'archées ont des morphotypes variés et originaux (Fig. 17) que l'on ne retrouve pas, pour la plupart, chez les virus infectant les bactéries et les eucaryotes (Prangishvili *et al.*, 2006b) (Fig. 18). Cette vaste diversité phénotypique contraste avec l'homogénéité morphotypique des bactériophages isolés, composés à 96% de caudovirus¹⁸ (Fig. 18, (Fauquet, 2005)).

Les virus d'archées et les bactériophages présentent, pour la grande majorité, un faible nombre de gènes homologues et une faible similarité entre ces gènes (Prangishvili *et al.*, 2006a). Sur la base de ces considérations morphotypiques et génétiques, il apparaît que plusieurs familles de virus sont spécifiques du domaine des *Archaea* (exemple : les *Fuselloviridae*, les *Rudiviridae*, ou les *Bicaudaviridae* (Fig. 18)).

Les caractéristiques uniques des virus infectant chacun des 3 domaines du vivant soulèvent l'hypothèse de l'existence de trois virosphères, chacune ayant spécifiquement évolué en relation avec un des trois domaines du vivant (Prangishvili *et al.*, 2006b). Néanmoins, plusieurs caudovirus de la famille des *Siphoviridae* et des *Myoviridae*, généralement associés à la virosphère des *Bacteria*, ont aussi été isolés à partir d'*Euryarchaeota*. Ces caudovirus pourraient être des virus ayant infecté l'ancêtre commun des *Bacteria* et des *Archaea* ou pourraient avoir été « transférés » des *Bacteria* aux *Archaea* après la séparation de ces 2 domaines (Pina *et al.*, 2011).

III.2. Les virus d'archées dans l'environnement

En l'absence d'un marqueur universel et unificateur des virus d'archées, la détermination de leur diversité et de leur distribution environnementale reste problématique (Breitbart and Rohwer, 2005). La construction et l'analyse de viromes¹⁹ offrent une alternative aux approches culturelles pour l'étude de la diversité virale. Elles demeurent néanmoins dépendantes de l'isolement de nouveaux virus pour la détermination de la fonction et de l'appartenance des gènes identifiés à partir de l'environnement. Ce couplage entre études moléculaires et culturelles offre de nouvelles perspectives pour l'étude des virus d'archées dans l'environnement (Snyder and Young, 2011). Ainsi, par exemple, l'identification récente d'une séquence codant pour une protéine virale impliquée dans un nouveau mécanisme de libération des virus a été identifiée (Virus-Induced Pyramidal

¹⁷Particule virale.

¹⁸Désigne les virus de l'ordre des *Caudovirales* qui sont des virus possédant une capsid et une queue, comprend les familles des *Siphoviridae*, des *Myoviridae* et des *Podoviridae*.

¹⁹Ensemble des génomes de virus d'un environnement.

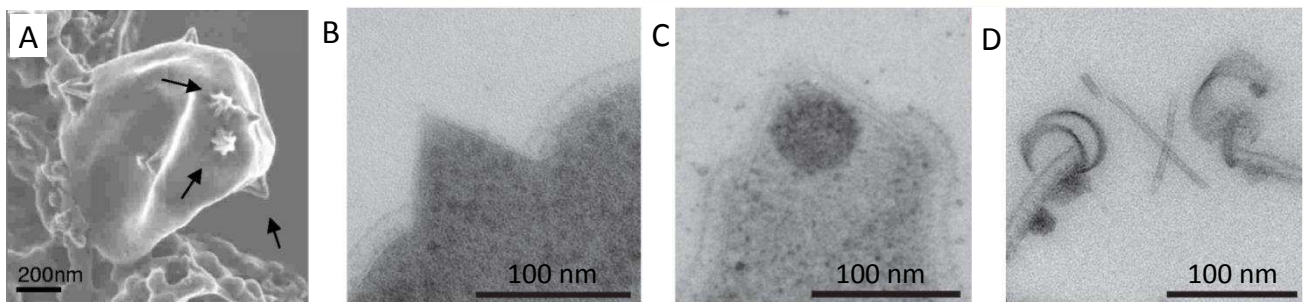


Figure 19 : Les VAPs (Virus-induced Pyramidal Formation) constituent un mécanisme de libération des virus uniquement rencontré dans le domaine des *Archaea*. Deux espèces virales infectant *Sulfolobus islandicus* sont connues pour former ces structures, STIV et SIRV2. (A) Visualisation en microscopie électronique à balayage des VAPs formées par STIV et en microscopie électronique à transmission sur des coupes fines des VAPs formées par SIRV2 fermées (B et C) et ouvertes (D). (A) d'après Snyder *et al.*, (2011) et (B-D) Quax *et al.*, (2011).

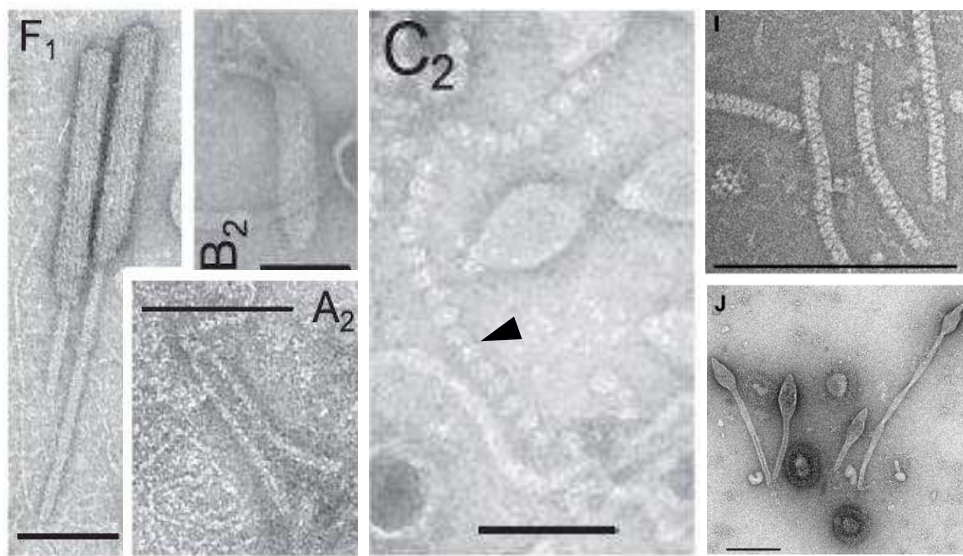


Figure 20 : Diversité morphotypique de potentielles particules virales encore non isolées. Les photos A₂, C₂, B₂, F₁ sont tirées de Sime-Ngando *et al.*, (2011) et les photos I et J de Rachel *et al.*, (2002).

formation, Fig. 19) à partir de couples virus-archées isolés (Snyder *et al.*, 2011b). La recherche de cette séquence dans des banques métagénomiques de sources hydrothermales a révélé qu'elle était largement répandue au sein de la virosphère archéenne de ces environnements et une dynamique temporelle de prévalence a pu être établie (Snyder *et al.*, 2011a).

III.2.a. Virosphère archéenne des environnements hypersalins et géothermaux

L'étude des virus d'archées se focalise, à l'heure actuelle, majoritairement sur les milieux extrêmes (Rohwer *et al.*, 2009). Les morphotypes de virus observés au microscope électronique à transmission (MET) dans les échantillons naturels issus de ces environnements correspondent aux morphotypes de la majorité des virus d'archées isolés. En accord avec la dominance des archées dans ces environnements, cette correspondance suggère que la virosphère des archées domine les environnements extrêmes. De ce fait, bien que la plupart des données rapportées depuis ces milieux englobe l'ensemble des phages de procaryotes, ces données concerneraient majoritairement les virus d'archées. Sur la base de cette hypothèse, il nous a paru intéressant de présenter les virus et les interactions qu'ils entretiennent potentiellement avec leur hôte dans ces environnements.

- Une forte similarité morphotypique mais une faible similarité génotypique

Les analyses en MET d'échantillons prélevés le long d'un gradient de salinité (1% à 36%) ont révélé que les morphotypes viraux icosaédriques (avec ou sans queue) sont très largement dominants en dessous de 24% de salinité et sont remplacés par des morphotypes associés à des virus d'archées au-dessus de 29% de salinité (Bettarel *et al.*, 2011). D'autres observations réalisées sur des échantillons issus de milieux hypersalins (Sime-Ngando *et al.*, 2011) et géothermaux (Prangishvili, 2003) ont également révélé une faible proportion (1 à 2 %) de caudovirus par rapport aux milieux modérés, une dominance de morphotypes associés aux virus d'archées, ainsi que des morphotypes potentiellement nouveaux (Fig. 20, (Rachel *et al.*, 2002; Sime-Ngando *et al.*, 2011)).

Ces 2 types de milieux (hypersalins et géothermaux), bien que présentant des conditions environnementales très contrastées, exhibent des morphotypes viraux communs (Sime-Ngando *et al.*, 2011) supportant l'hypothèse d'une virosphère propre aux domaines des *Archaea*. Cependant, les génomes de virus fusiformes isolés à partir de sources hydrothermales (Redder *et al.*, 2009) et de milieux hypersalins (His1, (Bath *et al.*, 2006)), de même que les viromes issus de ces 2 milieux (Sime-Ngando *et al.*, 2011), ont très peu de

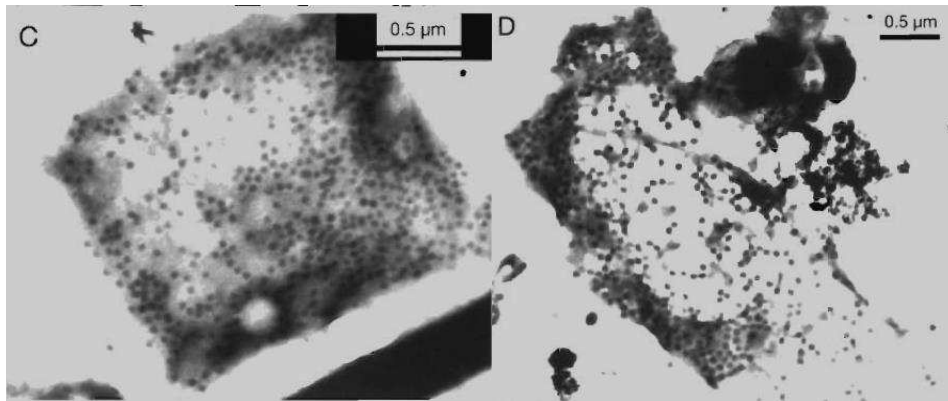


Figure 21 : Cellules d'archées carrées (de type *Haloquadratum* spp.) infectées par des virus. D'après Guixa-Boixareu *et al.*, (1996).

similarité, suggérant un fort degré d'adaptation génotypique des virus à ces milieux très différents (Sime-Ngando *et al.*, 2011).

- **Abondances virales de ces milieux extrêmes**

Des abondances virales importantes ont été déterminées dans ces environnements : de 10^7 à 10^9 particules virales par ml dans les milieux hypersalins (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996; Oren *et al.*, 1997; Bettarel *et al.*, 2011) et de 10^5 à 10^7 particules virales par ml dans des sources géothermales (Breitbart *et al.*, 2004a). Des abondances virales et procaryotiques croissantes ont été observées le long de gradients de salinité croissante (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996; Bettarel *et al.*, 2011) ainsi qu'à proximité de cheminées hydrothermales (Ortmann and Suttle, 2005). La forte corrélation entre les abondances virales et procaryotiques, et le maintien d'un important ratio virus/procaryotes le long de ces gradients suggèrent que les virus sont actifs jusqu'aux conditions les plus extrêmes (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996; Ortmann and Suttle, 2005; Bettarel *et al.*, 2011).

- **Quel cycle de vie viral ?**

L'infection lytique ne semble pas être la stratégie virale dominante dans les environnements géothermaux et hypersalins. En effet, l'observation de cellules infectées dans ces milieux est rare. Une seule étude rapporte la présence de phages fusiformes matures dans des cellules d'archées carrées d'*Haloquadratum* spp. (Fig. 21, (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996). De plus, Bettarel et collaborateurs (2011) ont observé que seule l'infection lysogénique survenait au-dessus de 12% de salinité. En milieu géothermal, il a été déterminé que la production virale et le contrôle de la communauté procaryotique par les virus étaient importants (Breitbart *et al.*, 2004a). Cependant aucune observation de cellule infectée n'a été rapportée dans cette étude.

Bien que des variations saisonnières de facteurs environnementaux puissent entraîner des modifications dans les relations virus-hôtes, et notamment le basculement du cycle lysogénique vers le cycle lytique (Maurice *et al.*, 2010), ces données environnementales sont en accord avec "l'infection persistante" que la plupart des virus d'archées isolés entretiennent avec leurs hôtes (Porter *et al.*, 2007; Pina *et al.*, 2011). Il est donc possible que les virus observés dans ces environnements soient issus de cycles chroniques ou de l'induction sporadique de prophages (Prangishvili *et al.*, 2006b; Bettarel *et al.*, 2011). Ces types d'infections permettraient aux virus de réduire leur exposition aux conditions environnementales hostiles dans les milieux géothermaux (Prangishvili and Garrett, 2005).

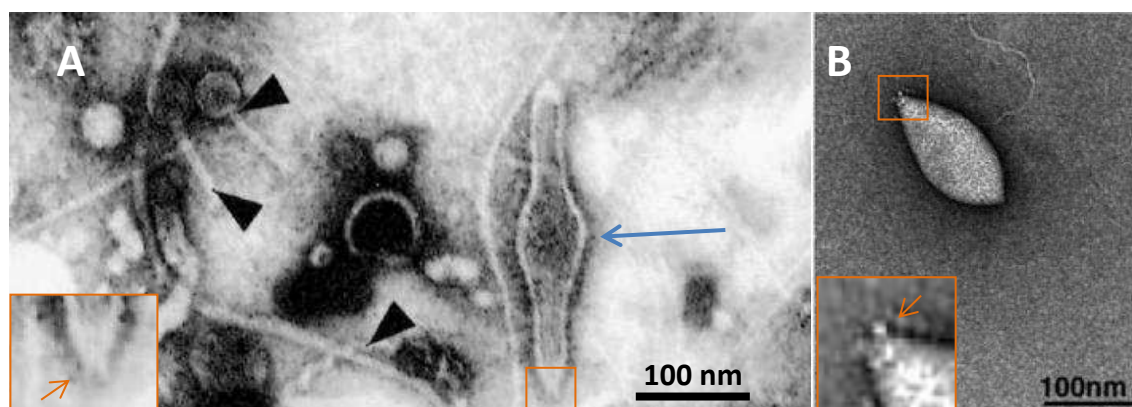


Figure 22 : Potentielles particules virales ayant une forme proche de morphotypes de virus d'archées. Forme typique des bicaudavirus, observée dans des sédiments estuariens saumâtres (A, flèche bleue) et forme typique des fusellovirus, observée dans un lac d'eau douce d'Antarctique (B). Un grossissement sur d'éventuels filaments terminaux (pointés par des flèche oranges) est affiché en bas à gauche de chaque photo, photo (A) d'après Middelboe *et al.*, (2003) et photo (B) d'après López-Bueno *et al.*, (2009).

Virus	Hôte	Morphotype	Cycle de vie	Auteurs
ψM1, ψM2	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Caudovirus	Lytique	Jordan <i>et al.</i> , (1989), Meile <i>et al.</i> , (1989), Pfister <i>et al.</i> , (1998)
ΦF1	<i>Methanobacterium spp.</i>	Caudovirus	Lytique	Nolling and Groffen (1993)
ΦF3	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Caudovirus	Lytique	Nolling and Groffen (1993)
PG	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Caudovirus	Lytique	Bertani and Baresi (1986)
PMS1	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Caudovirus	Lytique	Knox and J. E. Harris (1986)
VLP	<i>Methanococcus voltae</i> A3	Oblong	Tempéré (?)	Wood <i>et al.</i> , (1989)
MMV	<i>Methanofollis aquamarius</i>	Coccoïde	Chronique (?)	Lai and Chen (2001)

Tableau 3 : Liste des virus de méthanogènes isolés. En noir, les virus de méthanogènes thermophiles ; en bleu, les virus de méthanogènes mésophiles, adapté de Prangishvili *et al.*, (2006b).

Cependant cette hypothèse ne semble pas valable en milieu hypersalin où les virus libres se détériorent moins vite qu'en milieu de plus faible salinité (Bettarel *et al.*, 2011). L'infection chronique peut également être considérée comme une stratégie virale adaptée à un faible renouvellement des populations hôtes (Weinbauer, 2004). En accord avec cette hypothèse, une augmentation du temps de doublement (de 1 à 5 jours) de la population procaryote a été mesurée le long d'un gradient croissant de salinité (Guixa-Boixareu *et al.*, 1996). Le cycle chronique pourrait constituer un stress énergétique pour l'hôte en raison de la demande énergétique liée à la production de virus. En conséquence, ce type d'interaction hôte-virus a pu être favorisé par les adaptations particulières des archées au stress énergétique chronique (Valentine, 2007; Pina *et al.*, 2011).

III.2.b. Les virus d'archées dans les environnements non extrêmes

De très rares données issues d'observations, d'isolements et d'analyses de métagénomiques suggèrent ou attestent de l'infection d'archées dans les environnements non extrêmes.

1) Des morphotypes typiques des virus d'archées ont été observés dans des sédiments estuariens saumâtres (Middelboe *et al.*, 2003) et dans un lac d'Antarctique (López-Bueno *et al.*, 2009), bien que leur présence n'ait pas été soulignée par les auteurs (Fig. 22).

2) Des provirus ont été détectés dans les génomes d'*Euryarchaeota* méthanogènes, comme par exemple *Methanococcus maripaludis* (MmarC6-E2), *Methanobrevibacter smithii* (Msmi-Pro1) ou *Methanosarcina acetivorans* (Mace-Pro1) (Krupovic *et al.*, 2010), ainsi que dans le génome d'une espèce affiliée aux *Thaumarchaeota*, *Nitrososphaera viennensis* (Nvie-Pro1) (Krupovic *et al.*, 2011). Cependant il n'a pas été possible de déterminer si ces provirus étaient encore inductibles. En effet, bien que les gènes de structures (capside et queue) soient parfaitement conservés, aucun gène de réplication et d'intégration n'a pu être identifié.

3) Bien que des virus infectant les méthanogènes mésophiles et thermophiles aient été isolés depuis plus d'une vingtaine d'années (Tableau 3), leur implication dans la régulation de ce groupe fonctionnel clé n'a pas encore été établie. Les données disponibles (essentiellement sur les virus de méthanogènes thermophiles), suggèrent que ce sont majoritairement des caudovirus. Contrairement aux autres virus d'archées, les virus de méthanogènes semblent majoritairement lytiques (Tableau 3) et pourraient donc avoir un impact important dans la régulation des communautés de méthanogènes et donc sur les flux de méthane associés.

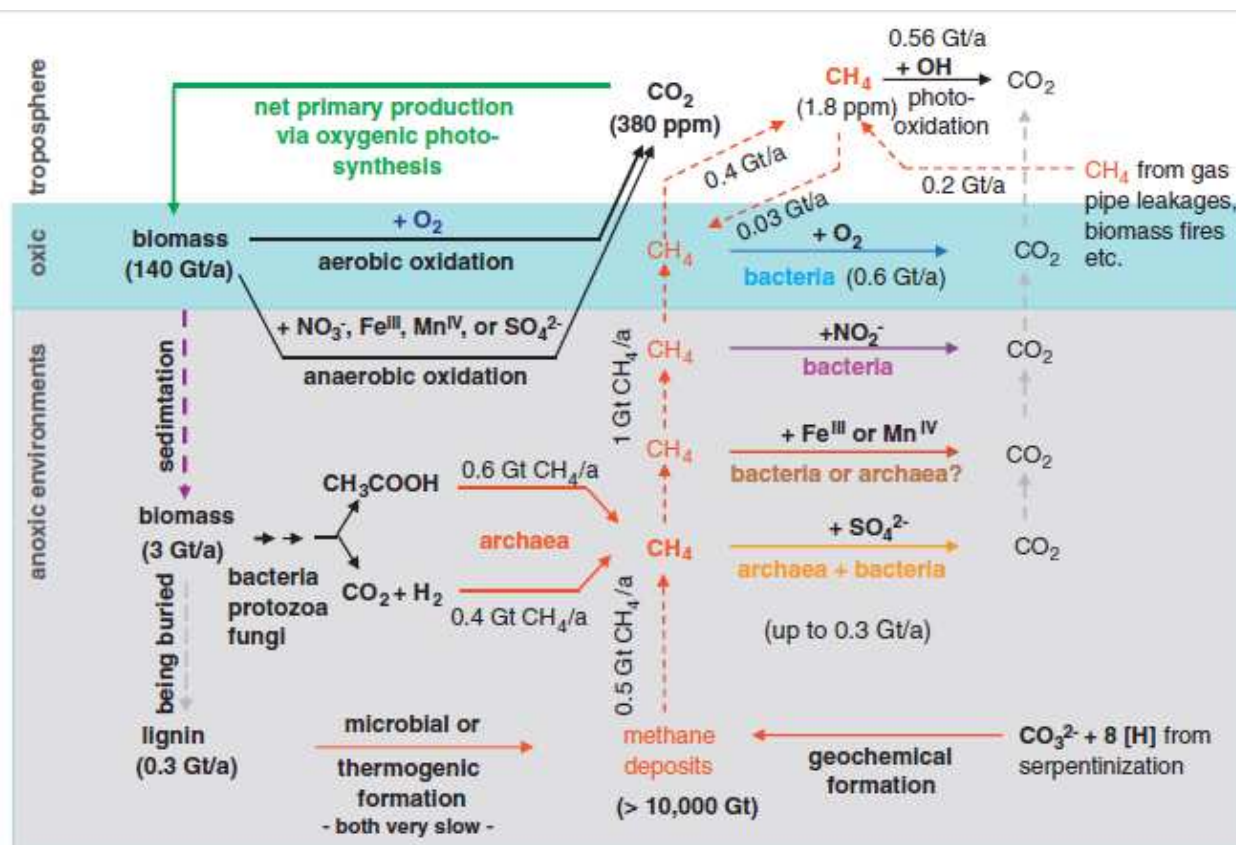


Figure 23 : Schéma du cycle du carbone soulignant le rôle du méthane comme intermédiaire métabolique et représentant les principales voies métaboliques impliquées dans sa production et sa consommation, d'après Thauer (2011).

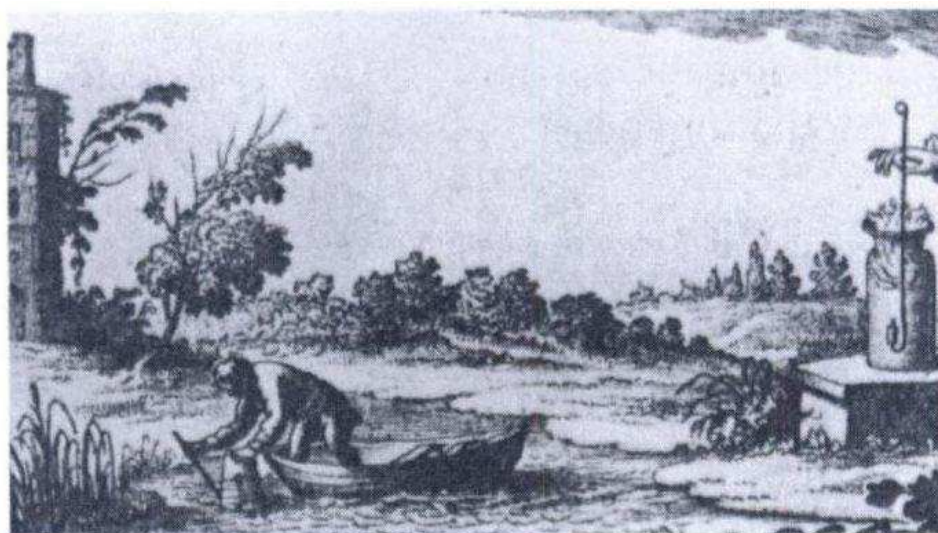


Figure 25 : L'expérience d'Alessandro Volta représentée par un artiste de l'époque. A droite, le dessin montre une bougie éteinte au fond de la flasque, illustrant la nécessité d'un contact avec l'air pour la combustion. Gravure d'époque, reprise de Wolfe (1993).

3ème Partie : Le méthane, un métabolite spécifiquement issu de l'activité des archées - Un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques lacustres

La méthanogenèse représente une voie métabolique uniquement réalisée par des microorganismes appartenant au domaine des *Archaea*. Le CH₄, produit final de la minéralisation anaérobie de la matière organique, joue un rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes et est au cœur de préoccupations sociétales dans le cadre du changement climatique global. Si la production biologique de méthane est l'apanage des archées, son oxydation (méthanotrophie) aérobie et anaérobie au sein des écosystèmes est sous la dépendance d'une grande diversité de microorganismes, bactéries ou archées. Dans ce chapitre, seront présentées deux sections relatives au bilan et aux mécanismes de transport du méthane dans les écosystèmes aquatiques lacustres. Dans une troisième partie, seront abordées les différentes voies métaboliques à l'origine de la production et de la consommation du méthane (Fig. 23) dans les lacs d'eau douce ainsi que les effets de facteurs environnementaux sur les taux de méthanogenèse et de méthanotrophie. Les principaux genres et espèces de méthanogènes et de méthanotrophes rencontrés dans les systèmes lacustres ont été répertoriés et des hypothèses sur leur dominance dans ces milieux seront proposées. Une attention particulière sera portée au processus d'oxydation anaérobie du méthane qui reste encore peu connu dans les environnements dulçaquicoles.

I- Le méthane

I.1. Généralités

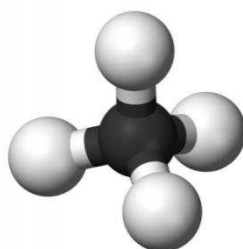


Figure 24 : Représentation en trois dimensions d'une molécule de méthane.

Le méthane (CH₄, Fig. 24) a été découvert par Alessandro Volta entre 1776 et 1778. Dans sa célèbre expérience (Fig. 25), Volta montra que le gaz libéré par les sédiments littoraux du Lac Majeur (Italie) était inflammable et avait donc une nature différente de celle de l'air (Wolfe, 1993). Le méthane, gaz inodore et incolore, est le plus simple des hydrocarbures et le principal constituant du gaz naturel.

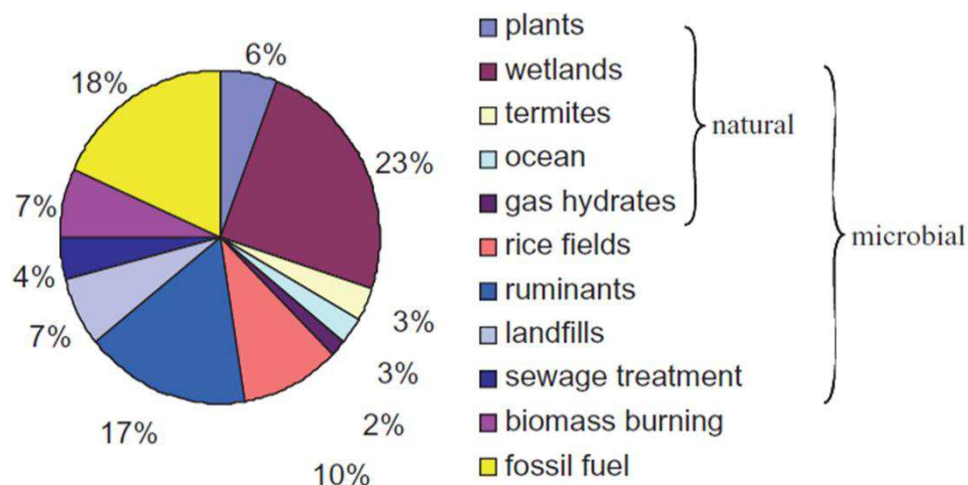


Figure 27 : Contribution des sources (naturelles et anthropiques) de méthane au budget atmosphérique total (500-600 Tg de méthane par an), d'après Conrad (2009).

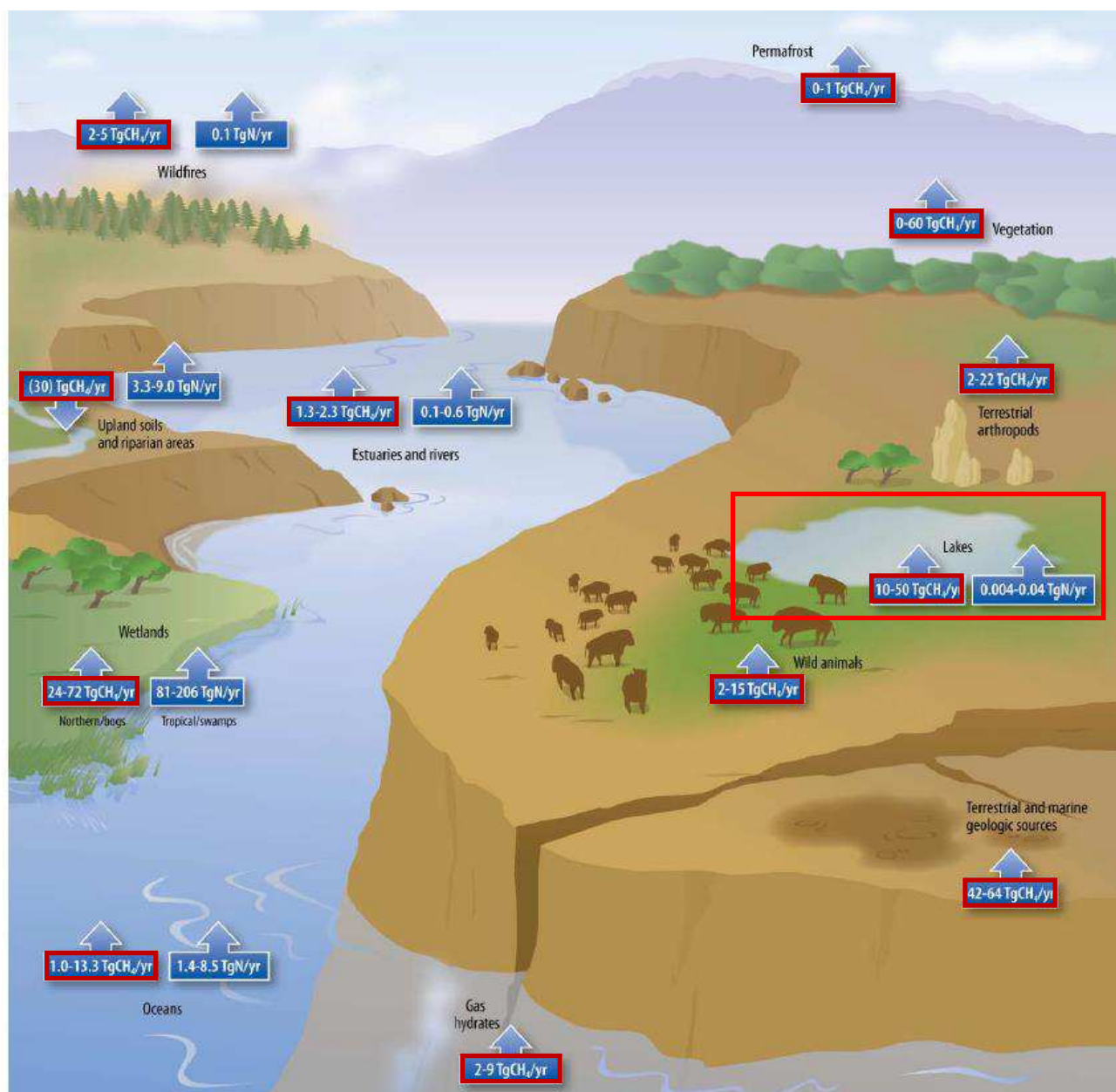


Figure 28 : Estimation des émissions annuelles de méthane et d'oxyde nitreux à partir de sources naturelles, en TéraGramme (Tg, 10^{12} g) par an. D'après le rapport 2009 de l'EPA (United States Environmental Protection Agency). L'estimation des émissions de méthane à partir des lacs est basée sur l'estimation Bastviken *et al.*, (2004).

Le méthane contribue au processus de réchauffement climatique. Le forçage radiatif²⁰ associé au CH₄ (+0,48 W.m⁻²) est le deuxième plus important après le CO₂ et contribuerait à ~30 % du forçage radiatif total, estimé à +1,6 [-1,0 ; + 0,8] W.m⁻² (Forster *et al.*, 2007). Depuis le début de l'ère industrielle, la concentration atmosphérique en CH₄ a augmenté d'environ 150 % (Fig. 26). Sa concentration atmosphérique actuelle est d'environ 1800 ppb (Dlugokencky *et al.*, 2009). Sur une période de 100 ans, il est estimé qu'une molécule de méthane a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO₂ (Solomon, 2007).

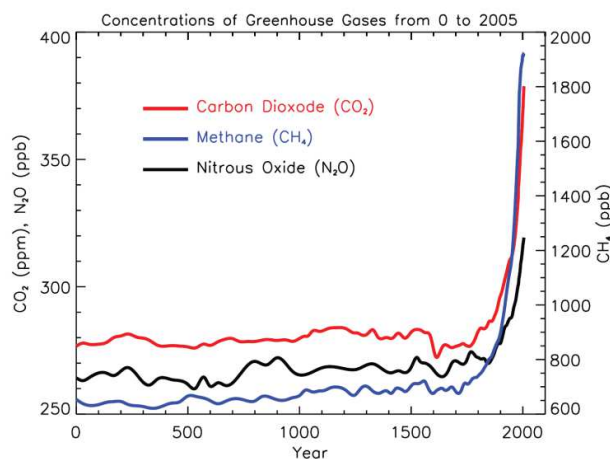


Figure 26 : Concentrations atmosphériques des principaux gaz à effet de serre de l'an 0 à l'an 2000. Les concentrations sont indiquées en partie par million (ppm) ou par milliard (ppb), indiquant le nombre de molécules de gaz à effet de serre par million ou milliard de "molécules d'air", d'après Solomon (2007).

1.2. Origine du méthane atmosphérique

Le bilan du méthane atmosphérique est estimé à 500 – 600 Tg CH₄ par an (Lelieveld *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; Conrad, 2009). La grande majorité du CH₄ atmosphérique (~75%) est d'origine biologique (Fig. 27 et 28). La combustion de la matière organique fossile, les feux de forêts et les sources géologiques telles que les écoulements froids des fonds océaniques représentent 25% des émissions globales de méthane (Fig. 27 et 28). La production de méthane par les plantes représente potentiellement une source importante de méthane atmosphérique (Keppler *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011). Cependant, cette source demeure controversée car la réaction biochimique à l'origine de la formation de méthane est encore inconnue et certaines études (Dueck *et al.*, 2007; Beerling *et al.*, 2008) n'ont pas réussi à reproduire les résultats de Keppler *et al.*, (2006). Le méthane est ainsi principalement d'origine microbienne (70 %, Fig. 27) et résulte de l'activité de microorganismes appartenant au domaine des *Archaea*.

²⁰Forçage radiatif : mesure de la modification de l'équilibre énergétique (énergie reçue / énergie émise) du système Terre-atmosphère en réponse à l'altération de facteurs affectant le climat. Quand le forçage radiatif d'un facteur ou d'un groupe de facteur est positif, l'énergie du système Terre-atmosphère augmente et entraîne un réchauffement du système.

source/sink term	E ^a	+	C ^b	=	P
animals	80		0		80
wetlands	115		27		142
bogs/tundra (boreal)	35		15		50
swamps/alluvial	80		12		92
rice production	100		477		577
biomass burning	55		0		55
termites	20		24		44
landfills	40		22		62
oceans, freshwaters	10		75.3		85.3
hydrates	5?		5		10
coal production	35		0		35
gas production	40		18		58
venting, flaring	10		0		10
distribution leaks ^c	30		18		48
<i>Total Sources</i>	500 ^d				
chemical destruction	-450				
soil consumption	-10		40		40 ^e
<i>Total Sinks</i>	-460 ^d		688.3		
			<i>Total Production</i>		1188.3

^a Scenario 7, ref 32. ^b From Table 1, ref 34. ^c Should be considered P. ^d 500 - 460 = 40 Tg CH₄ year⁻¹ = annual atmospheric increment (0.9% year⁻¹). ^e Soil consumption of atmospheric CH₄ added to the gross budget as an equivalent production term. ^f Reprinted from ref 2, Copyright 2003, with permission from Elsevier.

Tableau 4 : Emission (E), consommation (C), et production (P) globales nettes de CH₄ par les sources naturelles ou anthropiques. Exprimé en Téra gramme (Tg) de méthane par an ($E + C = P$)^f, d'après Reeburgh (2007).

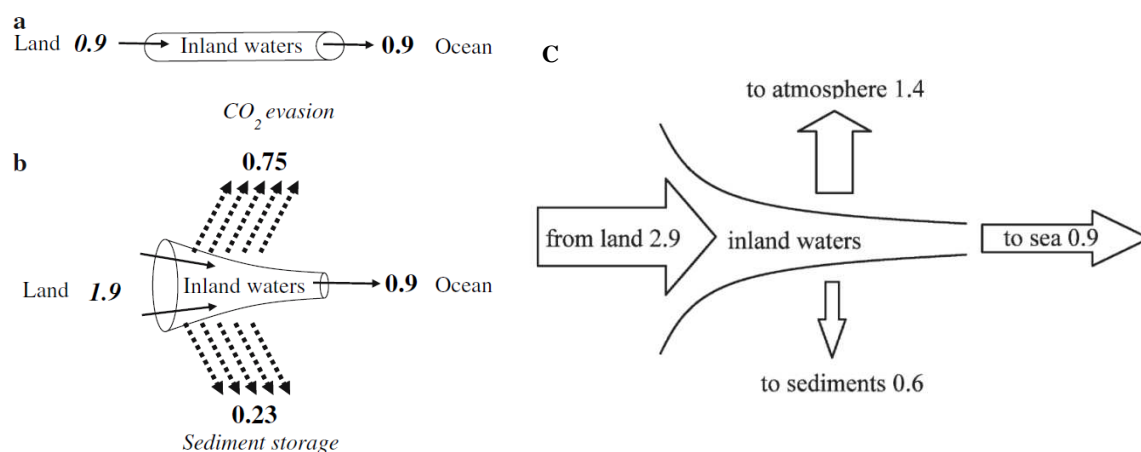


Figure 29 : Représentation schématique du rôle des systèmes aquatiques continentaux dans l'équilibre du carbone global. Représentation passée des systèmes aquatiques continentaux considérée majoritairement en tant que voie de transport du carbone d'origine terrestre vers les océans (a). Représentation du rôle de ces systèmes dans le stockage et l'émission atmosphérique de carbone basée sur les estimations de Cole *et al.*, (2007) (b) et de Tranvik *et al.*, (2009) (c). Les valeurs sont données en Pétagramme (10¹⁵ g) de carbone par an. (a) et (b) d'après Cole *et al.*, (2007) et (c) d'après Tranvik *et al.*, (2009).

I.3. Oxydation du méthane

Dans certains écosystèmes, tels que les lacs et les océans, les microorganismes méthanotrophes oxydent la majeure partie du méthane produit lors de son transport vers l'atmosphère (Tableau 4, (Reeburgh, 2007)). Ces organismes jouent ainsi un rôle prépondérant dans la régulation des émissions de méthane vers l'atmosphère. Lorsqu'il a atteint l'atmosphère, le méthane est majoritairement éliminé par un processus d'oxydation photochimique et minoritairement par les méthanotrophes des sols (Tableau 4, (Reeburgh, 2007)). La durée de vie moyenne du méthane dans l'atmosphère est d'environ 10 ans (Folland *et al.*, 2001) ; il est donc nécessaire d'identifier les microorganismes et les réactions métaboliques en jeu, et d'appréhender le cycle et les flux de cet élément au niveau des différents écosystèmes afin de prédire l'évolution de sa concentration atmosphérique.

II- Budget et transport du méthane dans les écosystèmes lacustres

Les systèmes aquatiques continentaux représentent une des principales sources naturelles de CH₄. Les dernières estimations de l'émission de méthane depuis ces écosystèmes²¹ sont de 103 Tg par an (Bastviken *et al.*, 2011). Cette récente étude estime que l'émission de gaz à effet de serre par les systèmes d'eau douce continentaux, majoritairement par les lacs, représenterait 79% de la quantité de gaz à effet de serre absorbée par les écosystèmes terrestres (Bastviken *et al.*, 2011).

II.1. Le CH₄ : un des principaux métabolites terminaux de la dégradation de la matière organique

Les écosystèmes aquatiques continentaux, longtemps considérés comme étant principalement des voies de transport du carbone terrestre vers les océans, sont en réalité des sites extrêmement actifs en termes de stockage et de transformation de la matière organique (Fig. 29, (Cole *et al.*, 2007; Tranvik *et al.*, 2009)). En effet, il a été estimé que l'enfouissement annuel de carbone organique dans les sédiments de lacs naturels et de réservoirs (200 Tg.an⁻¹) est deux fois plus important que dans les sédiments océaniques (Dean and Gorham, 1998). Une grande partie de cette matière organique, allochtone ou autochtone, est minéralisée en condition anaérobie (20 à 60% de la minéralisation totale (Hessen and Nygaard, 1992; Mattson and Likens, 1992; Utsumi *et al.*, 1998b)). Les conditions physico-chimiques favorisant généralement la méthanogenèse au détriment

²¹ Comprenant dans cette étude : les lacs, les rivières et les réservoirs.

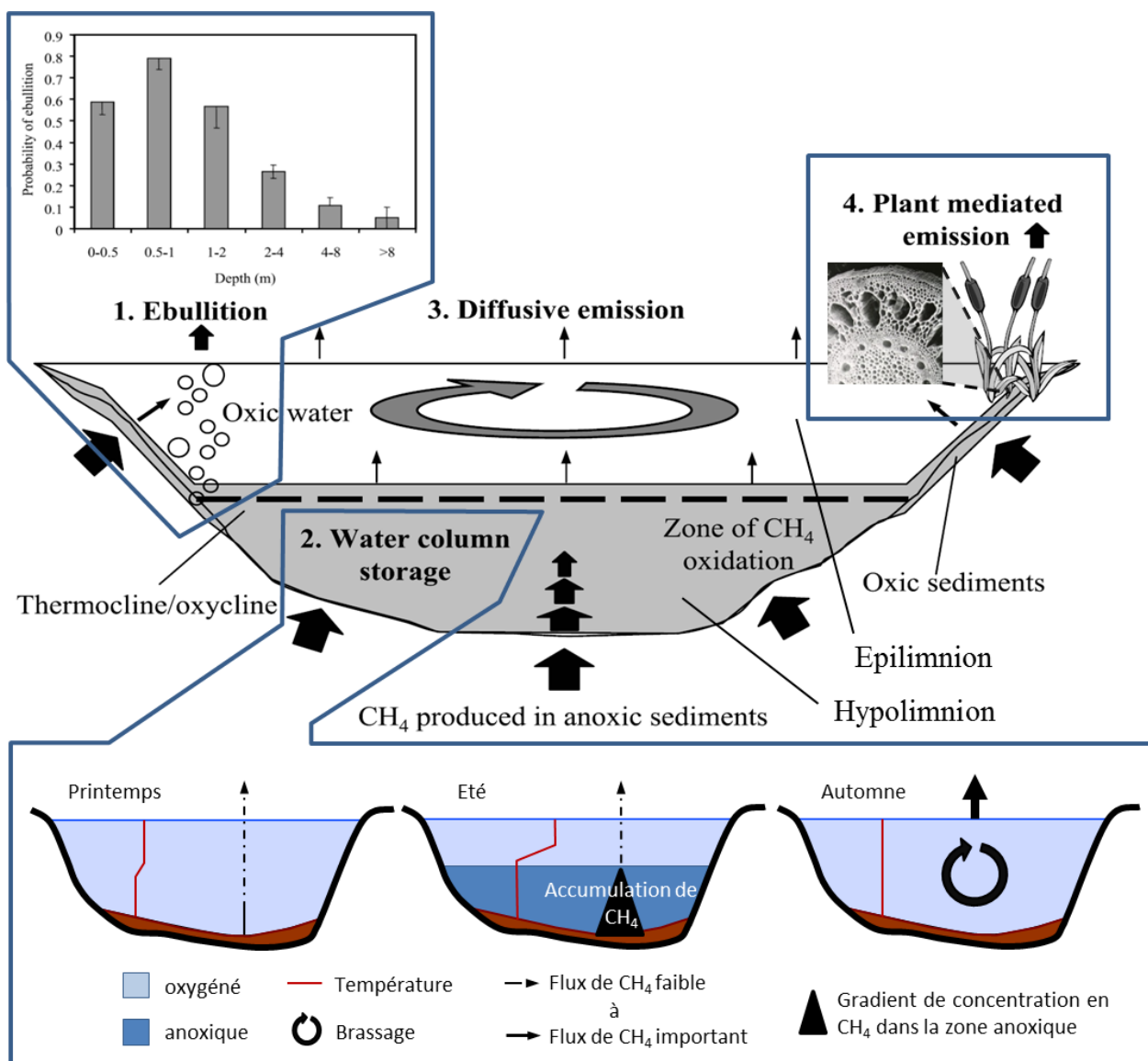


Figure 30 : Voies de transport du méthane dans les lacs. 1) L'ébullition, 2) Le stockage en période de stratification thermique qui mène à d'importantes émissions en période de brassage, 3) La diffusion, 4) Le transport par l'aérenchyme (photo MET) des macrophytes. Le diagramme en haut à gauche représente la probabilité d'ébullition en fonction de la hauteur de la colonne d'eau. Les mécanismes de stockage et d'émission du méthane lié à la stratification (été) et au brassage (automne) sont représentés en bas du schéma, modifié d'après Bastviken (2009).

d'autres processus métaboliques anaérobies (par exemple, la sulfato-réduction) dans les sédiments lacustres, ce métabolisme représente une des voies majeures de la dégradation de la matière organique sédimentant. La méthanogenèse représente ainsi 30 à 80% de la minéralisation anaérobie de la matière organique dans ces écosystèmes (Rudd and Hamilton, 1978; Fallon *et al.*, 1980; Kuivila *et al.*, 1988; Bédard and Knowles, 1991). Sur cette base, Bastviken *et al.*, (2008) estiment que 10 à 50% de la minéralisation totale du carbone des lacs se réaliserait via la méthanogenèse.

II.2. Transport du méthane dans les lacs

Les principales voies de transport du méthane dans les systèmes lacustres, depuis les strates anoxiques (colonne d'eau et/ou sédiment) vers l'atmosphère, sont les suivantes (Bastviken, 2009) :

1) L'ébullition

Le processus d'ébullition se produit lorsque les concentrations en CH₄ excèdent sa limite de solubilité. Le caractère apolaire du méthane le rend peu soluble dans l'eau. Ainsi, à 20°C, sa limite de solubilité est de 0,023 g par kg d'eau, contre 1,7 g par kg d'eau pour le dioxyde de carbone (CO₂), par exemple. La limite de solubilité étant fonction, notamment, de la température et de la pression hydrostatique, ce transport est prépondérant dans les zones littorales et se restreint avec la profondeur (Fig. 30). L'ébullition représenterait plus de 50% des émissions de méthane (Bastviken *et al.*, 2004).

2) La convection, lors des brassages saisonniers

En période de stratification thermique, le méthane s'accumule dans la zone anoxique profonde (hypolimnion) des lacs (Fig. 30). Les brassages saisonniers induisent une importante sursaturation en méthane des eaux de surface et engendrent une augmentation temporaire de son émission vers l'atmosphère. L'émission de méthane liée aux brassages saisonniers peut représenter de 24 à 86% des émissions totales de méthane vers l'atmosphère.

3) La diffusion et le transport turbulent

Le méthane dissous dans la colonne d'eau est transporté par diffusion. Les vitesses de diffusion sont faibles dans les zones de gradient (thermocline, chemocline), ou aux interfaces eau-sédiment. Dans les zones épilimniques, le transport peut être accéléré par la turbulence liée au vent. La diffusion et le transport turbulent pourraient être responsables de 26 à 48% du méthane émis par les lacs.

4) Transport par les plantes

Dans les zones littorales, le méthane peut aussi être transporté par l'aérenchyme des macrophytes. Ce tissu, présent dans les racines, contient des canaux formés par de larges cavités qui facilitent les échanges gazeux (oxygène, méthane...) entre la partie submergée et la partie immergée de la plante (Fig. 30).

II.3. Emissions de méthane

Une large fraction (30 à 99%) du méthane produit étant consommée lors de son transport vers la surface (Fallon *et al.*, 1980; Kuivila *et al.*, 1988; Frenzel *et al.*, 1990; Utsumi *et al.*, 1998b; Bastviken *et al.*, 2002; Liikanen *et al.*, 2002; Kankaala *et al.*, 2006), le méthane ne représente qu'une fraction mineure (~10%) du carbone total émis par les lacs (Huttunen *et al.*, 2003; Tranvik *et al.*, 2009; Bastviken *et al.*, 2011). Cependant, considérant les forçages radiatifs du CH₄ et du CO₂ (CH₄/CO₂=25), l'impact sur le réchauffement climatique global lié à l'émission de ces deux gaz à partir des lacs est probablement proche (Tranvik *et al.*, 2009). Durant les 20 dernières années, l'estimation des émissions de méthane à partir des lacs n'a cessé d'augmenter, passant de 5 Tg CH₄ par an (Cicerone and Oremland, 1988) à ~75 Tg CH₄ par an (Bastviken *et al.*, 2011) et il est probable qu'elle augmente encore dans les années à venir. Cette augmentation est liée à l'acquisition d'un nombre de données de plus en plus important sur les différentes sources de méthane à l'échelle globale, conduisant à des ré-évaluations régulières de l'importance de ces sources. Les données sur les lacs des régions tropicales et équatoriales, et particulièrement ceux d'Afrique et d'Asie, sont encore peu abondantes (Anderson *et al.*, 2009), bien que les flux de méthane mesurés dans les lacs situés à ces latitudes (2023 mmol m⁻² an⁻¹) soient plus élevés que ceux des lacs boréaux (311 mmol m⁻² an⁻¹) et tempérés (1110 mmol m⁻² an⁻¹) (Bastviken, 2009). Des études conséquentes doivent également être menées sur la spatialisation des flux de méthane dans les lacs. En effet, l'importance relative des différents transports et leur répartition spatiale à l'échelle du lac suggèrent que le méthane émis pourrait majoritairement provenir des zones littorales (Bastviken *et al.*, 2008). L'ébullition et le transport par les plantes, pour lesquels peu de données sont disponibles (Smith and Lewis, 1992; Bastviken *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006), pourraient représenter des sources importantes de méthane.

III- Production et consommation de méthane dans les écosystèmes lacustres dulçaquicoles (Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems)

Cette section a fait l'objet d'un article de synthèse dans la revue "**Research in microbiology**"

Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems

Guillaume Borrel^{a,b}, Didier Jézéquel^{d,e}, Corinne Biderre-Petit^{a,b}, Nicole Morel-Desrosiers^{a,b}, Jean-Pierre Morel^{a,b}, Pierre Peyret^{b,c}, Gérard Fonty^{a,b}, Anne-Catherine Lehours^{a,b}

^aClermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F63000, Clermont-Ferrand.

^bUMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France.

^cClermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F63000, Clermont-Ferrand.

^dUniversité Paris 7, Laboratoire de Géochimie des Eaux, Institut de Physique du Globe de Paris, UMR CNRS 7154, 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France.

^eUMR CNRS 7154, Université Paris 7, 75205 Paris Cedex 13, France.

I- *Problematic and budget of methane*

Atmospheric methane concentrations have increased dramatically since the pre-industrial era (157% since 1750). Over 100 years, each molecule of methane has 25 times the direct global warming of a molecule of carbon dioxide and according to EPA (United States Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/methane/>), methane is the second largest contributor to global warming. The current global budget of atmospheric methane is 500–600 Tg .year⁻¹ (Conrad, 2009). Whereas $\approx 25\%$ of all CH₄ emissions are associated with mining and combustion of fossil fuels or with burning of biomass (Conrad, 2009), microbial processes are the major sources as they contribute to 69% of atmospheric CH₄ concentrations. Such as for production, oxidation of CH₄ mainly depends upon microbial processes which are estimated to consume 60% of the biogenic methane produced in the environment (Reeburgh, 2007).

Although lakes cover only 0.9 % of the earth surface (Downing *et al.*, 2006), they would be responsible of 6-16% of the natural CH₄ emissions (Bastviken *et al.*, 2004) against less than 1% for oceans (Rhee *et al.*, 2009). Identify the microbial processes and their key agents as well as the factors that affect biological methane production and consumption in freshwater lakes is therefore critical.

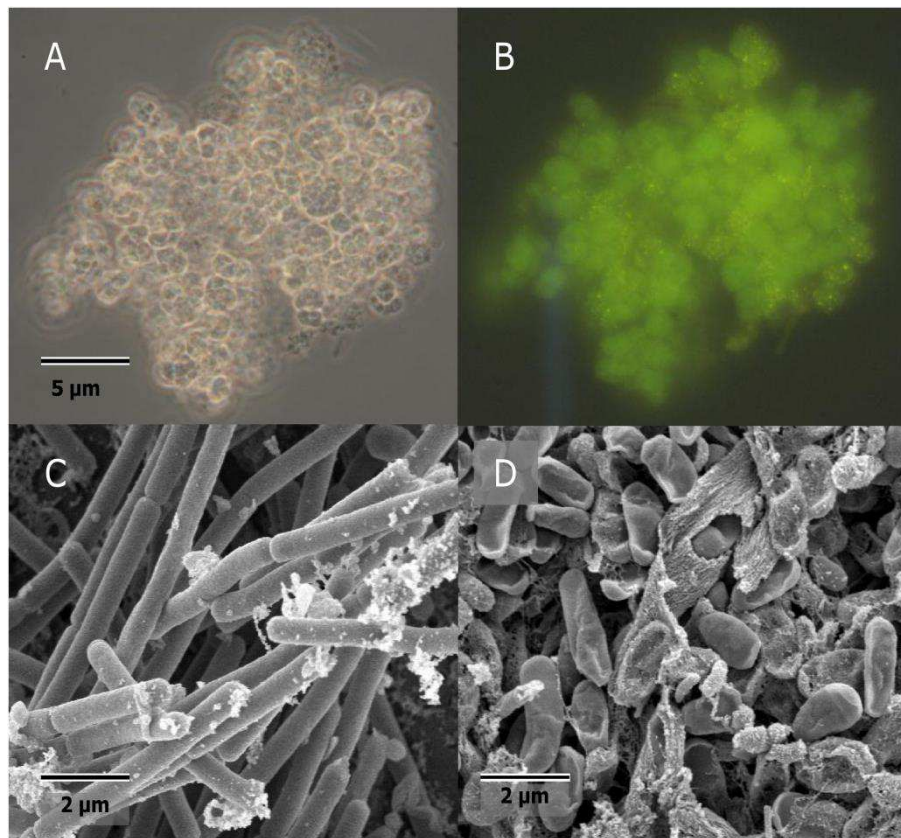


Figure 31: Methanogen and methanotroph strains cultivated from Lake Pavin A) Phase-contrast micrograph of *Methanosarcina* sp. from sediments; B) the same field, autofluorescence of cofactor F_{420} of methanogens is revealed by lightening at 420 nm; C) electron micrographs of *Methanobacterium* sp. strain 17A1 isolated from sediments; and D) *Methylocystis* sp. aggregated in exopolymers, isolated from a water column.

The different aspects of methane cycling have been reviewed in the environment (Canfield, 2005; Conrad, 2009), in ocean (Reeburgh, 2007), in inland water ecosystems (Bastviken, 2009), and in rice field (Conrad, 2007). In this paper, we propose a review on the microbial processes involved in the biogeochemical CH₄ cycle and on the factors affecting these processes in freshwater lake ecosystems. Fundamental processes of CH₄ production and oxidation and an inventory of the species and genera involved in methanogenesis and methanotrophy in freshwater lakes are presented. Out of necessity, a brief overview of CH₄ biochemistry is proposed. Emphasis will be placed on the anaerobic methane oxidation which represents a great deal of current biogeochemical research.

II- *Biogenic methane production*

Biogenic CH₄ is produced by the activities of methanogens, a strictly anaerobic metabolic group belonging to the *Archaea*. This group is ubiquitous in anaerobic environments such as anoxic water columns and sediments of freshwater lakes in which methanogenesis accounts for 10 – 50 % of the overall carbon mineralization (Bastviken *et al.*, 2008).

II.1. Methanogens

All known methanogens are affiliated to the *Euryarchaeota* and represent ~50 % of the overall cultivated archaeal species (Plasencia *et al.*, 2011). A phylogenetic analysis of 53 markers revealed that methanogens constitute a paraphyletic group²² (Bapteste *et al.*, 2005). While many studies suggest that not-yet-cultivated methanogens belong to new orders (Castro *et al.*, 2004; Juottonen *et al.*, 2005; Nettmann *et al.*, 2008; Mihajlovski *et al.*, 2010), all currently known (cultivated) methanogens are divided in six orders according to 16S rRNA sequences: *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* (Fig. 31A,B), *Methanocellales* (previously named RC-I), *Methanobacteriales* (Fig. 31C), *Methanococcales* and *Methanopyrales* (Fig. 32) (Bonin and Boone, 2006; Conrad *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2006; Kendall and Boone, 2006; Whitman *et al.*, 2006; Whitman and Jeanthon, 2006; Liu, 2010; Sakai *et al.*, 2010). The ecological diversity of methanogens have been reviewed elsewhere (Garcia *et al.*, 2000; Liu and Whitman, 2008).

²² Groupe qui ne rassemble pas tous les descendants d'un ancêtre commun.

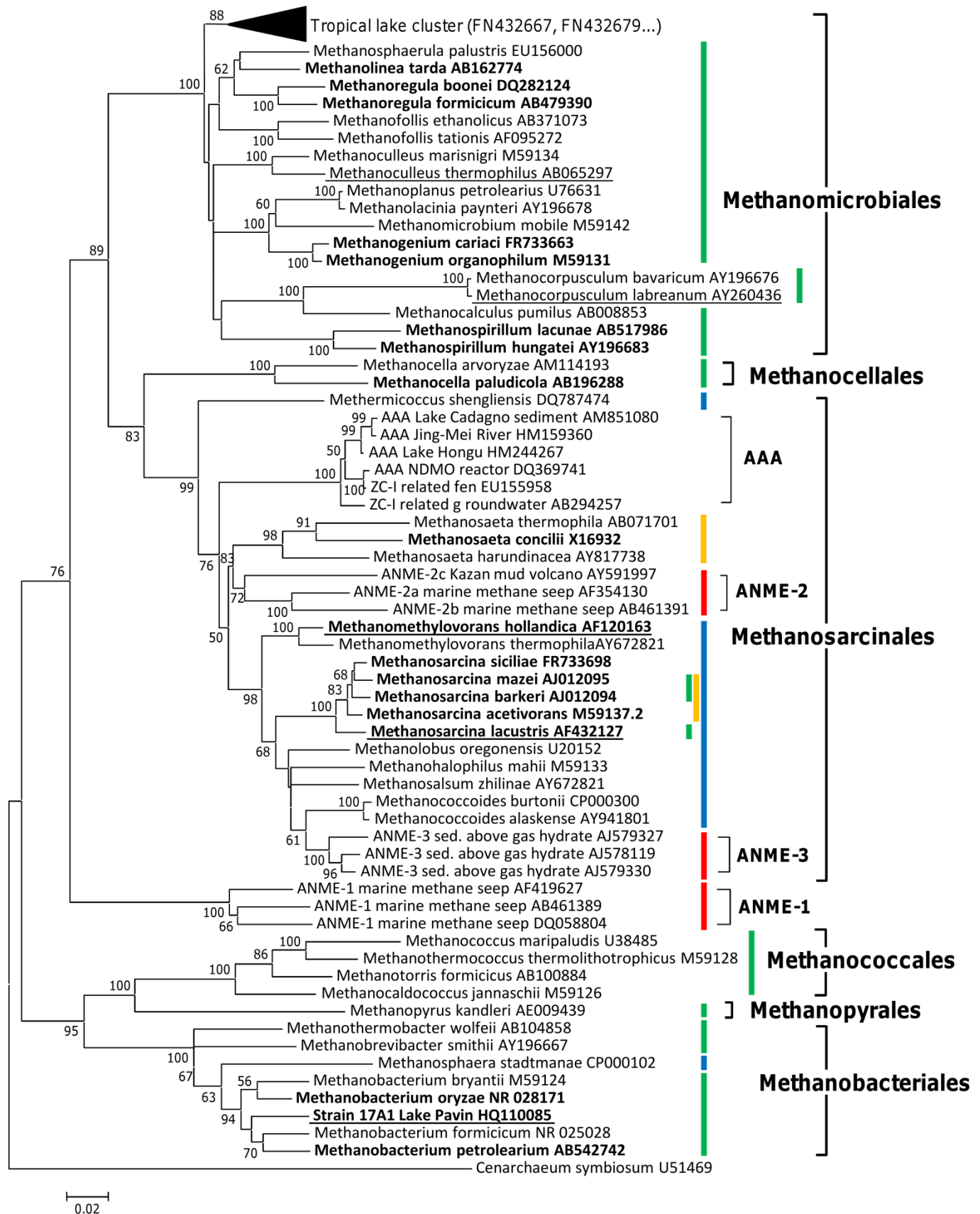


Figure 32: Phylogenetic tree illustrating relationships between the six methanogenic orders, the three ANME lineages and the AAA (AOM-associated archaea), all belonging to the archaeal domain. 16S rRNA sequences were recovered from cultivated strains for methanogens and from an environmental clone library for ANMEs and AAA. Sequences of type strains isolated from freshwater lakes are underlined. Sequences in bold have more than 97% similarity with at least one environmental sequence from freshwater lakes (analysis carried out on 468 archaeal sequences retrieved from 19 freshwater lakes). The colored lines denote the hydrogenotrophic (green), acetotrophic (orange) and methylotrophic (blue) methanogens, and the environmental sequences of anaerobic methanotrophs (red). Phylogenetic analyses were performed with MEGA4 (Tamura et al., 2007). Evolutionary history was inferred using the neighbor joining method (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap values greater than 50% derived from 1000 replicates are indicated. Tree is rooted with *Cenarchaeum symbiosum*.

II.2. Metabolic pathways and “the key enzyme” of the methanogenesis

Despite their wide phylogenetic diversity, methanogens constitute a highly specialized metabolic group of microorganisms. They use a narrow range of substrates which are generally the end products of organic matter degradation by fermentative *Bacteria* and *Eukarya*. These substrates are H_2/CO_2 , formate, acetate, methanol, methylated-compound, CO, ethanol, and secondary alcohol. A short description of methanogenic pathways and of their importance in freshwater lakes is presented. For further information, these pathways have been detailed by Hedderich and Withman (2006).

Three main metabolic pathways for CH_4 production are identified:

(1) Hydrogenotrophic methanogenesis: CO_2 reduction into CH_4 involved 4 H_2 and proceeds via carrier-bound one-carbon intermediates along the C1-reductive pathway (Hedderich and Whitman, 2006). In methanogenesis from formate, ethanol and secondary alcohols (2-propanol, 2-butanol, cyclopentanol and ethanol), the H_2 retrieved from these compounds is used to reduce CO_2 into CH_4 (Hedderich and Whitman, 2006). Hydrogenotrophic methanogenesis constitute the main sink of H_2 produced by fermentative *Bacteria*. Methanogens and fermentative *Bacteria* often grow in syntrophic consortia allowing methanogens to maintain low H_2 concentrations, a necessary condition for the fermentation process (Stams and Plugge, 2009). Hydrogenotrophic methanogenesis (from H_2/CO_2 and formate) is a commonly used pathway (Fig. 32) and contributes to a huge part of methane production in many environments including freshwater lakes. The theoretical values predict that hydrogenotrophic methanogenesis accounts for 30% of the overall methanogenesis in freshwater lakes, and the measured ratio of this process range from 0 to 100% (Conrad, 1999).

(2) Acetoclastic methanogenesis: acetate is catabolized by cleavage, with the carboxyl group oxidized into CO_2 and the methyl group reduced into CH_4 . This pathway is only performed by members of two genera, *Methanosarcina* and *Methanosaeta* (both belonging to the order *Methanosarcinales*, Fig. 32). This pathway of methane production often represents the most important methane source in cold and temperate freshwater lakes (Conrad, 1999).

(3) Methylotrophic methanogenesis: The methyl-group is first reduced in methyl-coenzyme M and then reduced to methane. The electrons for this reduction come from the oxidation of an additional methyl group into CO_2 using the reverse steps of the reductive C1-pathway

(Hedderich and Whitman, 2006). The methylotrophic methanogenesis pathway is performed by members of the *Methanosarcinaceae*, *Methermicoccaceae* (both belonging to the order *Methanosarcinales*, Fig. 32), the genus *Methanosphaera* and some species of the genus *Methanobacterium* (order *Methanobacteriales*, Fig. 32). While *Methanosarcinaceae* and *Methermicoccaceae* members are able to use a huge range of methylated compounds (*e.g.* methanol, mono- di- and trimethylamine, and methyl sulfides), the members of *Methanosphaera* only reduce methanol with H_2 (for more details, see Hedderich and Whitman, 2006). Unlike the hydrogenotrophic and acetoclastic methanogens, methylotrophic methanogens do not compete with sulfate reducing bacteria for substrate uptake (so-called “noncompetitive substrate” (Oremland and Polcin, 1982)) and may thus grow in zones where alternative electron acceptors are not depleted (see section II.3). This process is expected to be low in freshwater lakes since precursors of methyl compounds (*e.g.* pectin, cholin, osmoregulator such as glycine betain) are not abundant (Zinder and Brock, 1978; Lovley and Klug, 1983a; Lomans *et al.*, 1997). However, methylotrophic methanogenesis was observed in numerous freshwater lake sediments and was mainly performed by *Methanomethylovans hollandica* and closely related methanogenic species (Lomans *et al.*, 2001).

All of these methanogenic pathways share the same final enzymatic step catalyzed by the methyl-coenzyme M reductase (MCR), often referred as the “key enzyme of methanogenesis” (Ermler *et al.*, 1997). MCR is unique to methanogens (Thauer, 1998) and, as developed latter in this paper (section III.2.a), to archaeal anaerobic methanotrophs (Hallam *et al.*, 2003). Hence, MCR constitutes a functional marker of microorganisms involved in these metabolisms (Luton *et al.*, 2002; Steinberg and Regan, 2009). Particularly, the *mcrA* gene, coding for the α -subunit of MCR, contains highly conserved regions and its phylogeny is congruent with that of 16S rRNA (Springer *et al.*, 1995). The *mcrA* gene is used to investigate the diversity, structure, distribution and ecology of methanogenic communities in freshwater lakes (Earl *et al.*, 2003; Conrad *et al.*, 2010; Milferstedt *et al.*, 2010).

II.3. Examples of environmental factors affecting methane production rates in freshwater lakes ecosystems

Methane production rates (MPR) are variable according to lake characteristics and to their location. Many factors impact MPR either by affecting directly methanogens, or indirectly by structuring the surrounding microbial community which contains suppliers of methanogenic substrates and competitors for these substrates. Note that the influence of

environmental factors on the dominant methanogenic pathways in freshwater lakes, not addressed in this section, has also been studied (Schulz and Conrad, 1996; Nüsslein *et al.*, 2003; Glissmann *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; Nozhevnikova *et al.*, 2007).

Oxygen

Methanogenesis is highly inhibited by oxygen, because of the oxygen sensitivity of several cofactors and enzymes (*e.g.* CO dehydrogenase–acetyl-CoA synthase, F₄₂₀) involved in this metabolism (Schonheit *et al.*, 1981; Ragsdale and Kumar, 1996). In freshwater lakes, anoxic conditions are typically found in the sediment where oxygen is generally depleted under few millimeters. Anoxic conditions can also be found in lake water columns. This is transitory the case in the hypolimnion of highly productive lakes (eutrophic) during the summer stratification. In meromictic lakes, the permanently anoxic deep water layer (called the monimolimnion) hosts abundant methanogenic communities responsible of significant MPR (Winfrey and Zeikus, 1979; Lehours *et al.*, 2005; Wand *et al.*, 2006). It was proposed that weak methanogenesis might occur in anoxic microniches (*i.e.* dead algal aggregates) in oxic water column (Schulz *et al.*, 2001) and surficial sediments (Conrad 2007). Recently, the paradigm that methanogenesis happens primarily in anoxic environments was challenged by Grossart *et al.*, (2011).

Competition for substrate acquisition

Under anoxic conditions in sediment or water column, another important factor is the availability of alternative electron acceptors (*i.e.* SO₄²⁻, Mn(IV), Fe(III), NO₂⁻, NO₃⁻) used for anaerobic respiration by sulfate-reducing bacteria, iron-reducing bacteria and denitrifying bacteria. These metabolic groups out-compete methanogens for uptake of H₂ and acetate (Winfrey and Zeikus, 1977; Lovley and Phillips, 1987; Achtnich *et al.*, 1995). Interactions between methanogens and sulfate reducing bacteria were particularly studied in freshwater lakes (Lovley and Klug, 1983b; Lovley and Klug, 1986; Kuivila *et al.*, 1989; Sinke *et al.*, 1992; Koizumi *et al.*, 2003b). Sulfate concentrations are low in most freshwater systems (only 100-200 µM compared to 20-30 mM in seawater (Capone and Kiene, 1988)), and sulfate is rapidly depleted with sediment depth, allowing a significant methanogenesis under few centimeters below the sediment surface. In lakes Biwa and Washington, significant MPR were measured below 2 and 16 cm, respectively, where sulfate concentrations decreased under 30 µM (Kuivila *et al.*, 1989; Koizumi *et al.*, 2003b). These observations fit with the theoretical value determined by Lovley and Klug (1986) which predicted a shift from sulfate reduction to methanogenesis under 30 µM of sulfate. Competition between sulfate-reducing bacteria and

methanogens and the related MPR fluctuate seasonally, depending on the sulfate concentrations and on the input of organic matter by sedimentation (Sinke *et al.*, 1992).

Organic matter content and quality

The concentrations of H₂ and acetate in the methanogenic zone of freshwater lakes are low, generally around 10 nM for H₂ (Lovley and Goodwin, 1988) and between 5 and 60 µM for acetate (Nüsslein *et al.*, 2001; Glissmann *et al.*, 2004; Conrad *et al.*, 2007; Conrad *et al.*, 2010). For comparison, H₂ concentrations in the rumen are up to three order of magnitude above those encountered in freshwater sediments (Lovley and Goodwin, 1988; Zinder, 1993; Janssen, 2010). These concentrations of acetate and H₂ are close to the minimal threshold for substrate uptake by *Methanosaeta* (7–70 µM; Jetten *et al.*, 1992) and by hydrogenotrophic methanogens (Zinder, 1993) and reflect the limitation of methane production rates by substrate availability.

In permanent or temporary stratified freshwater lakes, when the water column above the sediment is anoxic and contains low sulfate concentrations (< 30 µM), MPR is maximal at the water-sediment interface (Falz *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008) and strongly decrease within the first ten centimeters of sediments. This trend is attributed to the decrease of content and lability of organic matter which becomes more and more depleted and recalcitrant with depth due to its longer exposure to degradation processed.

Seasonal inputs of fresh organic carbon by sedimentation processes stimulate methanogenesis in surface sediment but also in deeper sediment layer by diffusion of dissolved labile organic matter (such as acetate, propionate, isopropanol, caproate (Schulz and Conrad, 1995; Chan *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2008)).

The intensity of methanogenesis seems to be positively linked to the lake trophic level, probably indirectly, by increasing the quantity and quality of organic matter available (Bastviken, 2009). Indeed, MPR are higher in lake sediments with low C:N ratio (< 10) than in sediment with high C:N ratio (> 10) (Duc *et al.*, 2010).

Temperature

In the deep sediments of freshwater lakes from temperate and boreal (mid-latitude) regions, MPR are limited by low temperature since incubation of deep sediment samples at higher temperatures than *in situ* temperatures increase MPR (Zeikus and Winfrey, 1976;

Genus	Occurrence in freshwater lakes (%; n = 19)	Fraction of overall methanogen sequences from freshwater lakes (%; n = 275)
Methanoregula	89,5	33,1
Methanosaeta	78,9	22,9
Methanolinea	36,8	4,7
Methanobacterium	31,6	3,3
Methanospirillum	26,3	2,5
Methanosarcina	10,5	6,2
Methanogenium	5,3	1,5
Methanomethylovorans	5,3	0,4
Methanocella	5,3	0,4
Not affiliated to any known methanogen genera	78,9	25,1

Table 5: Occurrence of methanogenic genera and distribution of methanogen sequences belonging to these genera in freshwater lakes. This analysis was performed based on data from 19 freshwater lakes and 468 archaeal 16S rRNA sequences. Sequences were first aligned with sequences of cultivated methanogens belonging to all methanogen genera. Phylogenetic trees were constructed and 275 sequences affiliated with or closely related to methanogen orders were kept. These sequences were compared using Blast2n software optimized for highly similar sequences (megablast) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) to their closest isolated species. A sequence exhibiting 95% similarity with a sequence of a cultivated species was affiliated with the same genus, whereas others were classified as “not affiliated with any known methanogen genera”. In case of possible affiliation to two genera, sequences were affiliated with the genera of the most similar sequences of cultivated species. The affiliations of environmental sequences with genera were confirmed by phylogenetic analyses.

Schulz and Conrad, 1996; Nozhevnikova *et al.*, 2007; Duc *et al.*, 2010). Limitation of methanogenesis by temperature results from:

- direct effect: *in situ* temperature is generally below the growth optimum required by methanogens (according to cultivable methanogenic species).
- indirect effects: low temperatures limit the activities of H₂-producing syntrophs (Chin and Conrad, 1995; Schulz and Conrad, 1996) and then limit the rate of production of methanogenic substrates, particularly those for hydrogenotrophic methanogens.

Therefore, the seasonal variation of temperature entails changes in MPR (Zeikus and Winfrey, 1976). Methane production rates in the shallow sediments should be more sensitive to seasonal variations of temperature than in the deep sediments since the amplitude of these variations decrease with depth (Zeikus and Winfrey, 1976).

II.4. Composition pattern of methanogenic community in freshwater lakes

Dominant methanogenic communities

In freshwater sediments, analysis of clone libraries and/or quantification of methanogenic communities by fluorescent *in situ* hybridization revealed that the *Methanomicrobiales* and the *Methanosarcinales* dominate the methanogenic communities (Falz *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2005; Briee *et al.*, 2007; Lehours *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2007; Auguet *et al.*, 2010) and that the *Methanobacteriales* occur scarcely (Nüsslein *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2009; Conrad *et al.*, 2010). According to available data and to the analysis performed in this review (Table 5), 9 known genera are mainly retrieved and represent 75 % of the sequences of methanogens. The hydrogenotrophic genus *Methanoregula* (order *Methanomicrobiales*) is recovered in almost all 16S rRNA archaeal clone libraries created from freshwater lakes (Table 5) and sequences of this genus represent one third of the 16S rRNA sequences of methanogens from freshwater lakes available in international databases (Table 5). Therefore, the genus *Methanoregula*, belonging to the previously uncultured “fen cluster” (Galand *et al.*, 2002) also called “E1/E2” (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2006), now named *Methanoregulaceae* (Sakai *et al.*, in press), largely retrieved in peatlands, is expected to greatly contribute to methane production in freshwater lakes. Others frequently encountered genera are *Methanolinea*, *Methanospirillum* and *Methanobacterium* which are hydrogenotrophic methanogens (Table 5). *Methanosaeta* is the second most encountered genus and is responsible of the most of methane production from acetate in freshwater lakes. While the 16S rRNA sequences of *Methanoregula*,

Methanosaeta and *Methanolinea* represent 60 % of sequences of methanogens retrieved from freshwater lakes so far, to our knowledge no strain or type strains were isolated from these ecosystems (Fig. 32). Moreover, according to a cutoff value of 97 % with sequences of cultivated species, some representatives of these genera constitute new species which probably harbor original physiological features fitting with life in freshwater lake environments.

Environmental factors influencing methanogenic community composition

The substrate availability in freshwater lakes (see section II.3) might explain, for a part, the distribution of methanogenic genera. Accordingly, the dominant and the most commonly encountered methanogenic genera (*Methanoregula*, *Methanosaeta*, *Methanolinea*, Table 5) in these ecosystems are represented by species competitive at low substrate concentrations (Janssen, 2003; Imachi *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2009; Yashiro *et al.*, 2009). For example, *Methanosaeta* members outcompete *Methanosarcina* at low acetate concentrations like those prevailing in freshwater lakes (Jetten *et al.*, 1992). Moreover, *Methanoregula formicica*, *Methanolinea tarda* and *Methanosaeta* spp. were cultivated in co-culture in which they syntrophically degraded propionate (Imachi *et al.*, 2008; Yashiro *et al.*, 2009) and isopropanol (Janssen, 2003), two intermediate metabolites produced during anaerobic degradation of phytoplanktonic material in freshwater lakes (Schulz and Conrad, 1995; Glissmann *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2008). In contrast, *Methanobacterium* were mostly retrieved in lakes with high carbon concentrations such as hypereutrophic (Ye *et al.*, 2009), eutrophic (Earl *et al.*, 2003) or dystrophic (Chan *et al.*, 2002) lakes, reflecting a possible adaptation of members of this genus to high substrate supply (Lu *et al.*, 2005; Karadagli and Rittmann, 2007; Sakai *et al.*, 2009). It could be noted that strains and type strains of *Methanobacterium* and *Methanosarcinaceae* were commonly cultivated from freshwater lakes by using media with high substrate concentrations (Fig. 31 and 32, Zeikus and Winfrey 1976, Bonin and Boon, 2006, Kendall and Boone, 2006, Borrel unpublished data). This suggests that these genera commonly occur in freshwater lakes even as rare species.

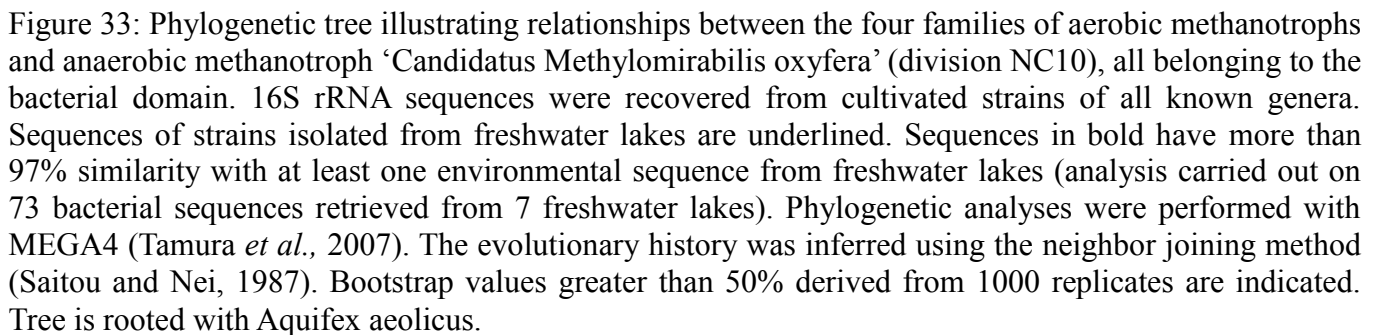
Freshwater lakes dwelling methanogenic communities were mainly studied in the hypolimnion and in the deep sediment of mid-latitude lakes where low temperatures (<15°C) prevail throughout the year. Accordingly, cold-adapted representatives (psychrotolerant and psychrophilic) should dominate in these systems, and these identified methanogenic

community are putatively not representative of methanogens from tropical and equatorial lakes or from shallow sediments of temperate lakes. The results of a recent study on the methanogenic communities of two tropical lakes (sediment temperature $\approx 30^{\circ}\text{C}$ (Conrad *et al.*, 2010)) are in agreement with that hypothesis. Several particularities distinguish these communities from those identified in mid-latitude lakes. High proportion of methanogenic sequences unaffiliated to known genera (one half of the unaffiliated sequence in table 5) were retrieved in these tropical lakes and several sequences grouped in a large cluster within the *Methanomicrobiales* which do not contained any sequences from other lakes (Tropical lake cluster, Fig. 32). Interestingly, sequences of *Methanocellales*, an order typical of rice paddy soils, were retrieved in significant proportion. Apart from an enrichment culture from Lake Rotzee, this order has never been detected in freshwater lake before (Faltz *et al.* 1999). This is a surprising observation as this group seems to be advantaged by low H_2 concentrations like those prevailing in lakes (Conrad *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2009). It could be hypothesized that the constantly high temperature of the tropical climate gives an advantage to this order (proposed as a moderately thermophilic group (Wu *et al.*, 2006)) to compete with commonly dominant methanogens of temperate lakes. Conrad *et al.* (2010) also suggested that the occurrence of macrophytes belonging to the genus *Oryza* (as in rice field) might also explain the presence of *Methanocellales* in these tropical lakes. Hence, other studies are needed to delineate the main actors of methanogenesis in tropical/equatorial lakes which are strong sources of atmospheric methane (Downing *et al.*, 2006; Bastviken, 2009; Bastviken *et al.*, 2010).

III- *Microbial methane consumption*

The efficiency of the biological methane oxidation depends on the physico-chemical conditions and on the way of methane transport. Four different ways are identified for CH_4 transport throughout water column and/or sediment (Bastviken, 2009): ebullition, plant mediated flux, diffusion and advection during seasonal overturn. Only the two last ways allow biological methane oxidation.

Biological methane oxidation is performed by methanotrophs which oxidize 30 to 99 % of the CH_4 produced in freshwater lakes (Bastviken *et al.*, 2008) and then play a fundamental role in



the regulation of methane emissions. Two biological pathways may be involved in methane oxidation in freshwater lakes:

- The aerobic methane oxidation, first described at the beginning of the XXth century (Kaserer, 1905; Sohngen, 1906).
- The anaerobic methane oxidation pathway, thought to be impossible until the 1970s. The microorganisms involved were only identified during the last decade and have not been isolated in pure culture so far (Hinrichs *et al.*, 1999; Raghoebarsing *et al.*, 2006).

For more details, several reviews could be found on aerobic (Hanson and Hanson, 1996; Trotsenko and Murrell, 2008; Semrau *et al.*, 2010) and anaerobic oxidation of methane (Valentine, 2002; Widdel *et al.*, 2006; Thauer and Shima, 2008; Knittel and Boetius, 2009).

III.1 Aerobic methane oxidation

III.1.a. Aerobic methanotrophs

All known aerobic methanotrophs are affiliated to *Bacteria* and constitute a polyphyletic group which belongs to 4 families affiliated to the γ -*Proteobacteria* (*Methylococcaceae*, *Methylocystaceae*), the α -*Proteobacteria* (*Beijerinckiaceae*) and to the *Verrucomicrobia* (*Methylacidiphilaceae*) (Fig. 33):

- *Methylococcaceae* (known as Type I): the intracytoplasmic membrane (ICM) forms bundles of vesicular disks distributed throughout the cell. These methanotrophs use the ribulose monophosphate pathway for carbon fixation and their phospholipid fatty acid (PFLAs) composition is generally dominated by 16C (16 carbon long chain).
- *Methylocystaceae* (known as Type II; Fig. 31D): the ICM is parallel to the cell membrane. They use the serine pathway for carbon fixation and PFLAs are dominated by 18C (18 carbon long chain), except *Methylocystis heyeri* which also contained large amount of 16C (Dedysh *et al.*, 2007).
- *Beijerinckiaceae*: This family is metabolically diversified, with obligate methanotrophs, facultative methanotrophs, and non-methanotrophs (Dunfield *et al.*, 2010).
- *Methylacidiphilaceae*: three acidophilic and thermotolerant species are affiliated to this family at this time (Dunfield *et al.*, 2007; Pol *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2008; Op den Camp *et al.*, 2009).

III.1.b Metabolic pathways and enzymes involved

While several facultative methanotrophs (belonging to genus *Methylocella* (Dedysh *et al.*, 2005), *Crenothrix* (Stoecker *et al.*, 2006), *Methylocystis* (Belova *et al.*, 2011; Im *et al.*, 2011), and *Methylocapsa* (Dunfield *et al.*, 2010) were recently isolated, most of the aerobic methanotrophs are obligatory C₁ users and are only able to grow on methane or methanol. Methane oxidation pathway contains four sequential oxidation steps with methanol, formaldehyde, and formate as metabolic intermediates. Formaldehyde plays a central role in the metabolism of aerobic methanotrophs since it also constitutes the main carbon source for the anabolic pathway. The first step (conversion of CH₄ to methanol) is catalyzed by the methane monooxygenase (MMO) enzymatic complex. Two distinct forms of MMO complex have been identified at different cellular locations, a cytoplasmic soluble form (sMMO) and a particulate form generally bound to ICM (pMMO) (Lipscomb, 1994). All aerobic methanotrophs possess the pMMO except *Methylocella* (Dedysh *et al.*, 2000) and *Methyloferula* (Vorobev *et al.*, 2010) species which only possess the sMMO. In contrast sMMO is not found in all methanotrophs (Murrell *et al.*, 2000).

Such as MCR for methanogens, MMO is unique to aerobic methanotrophs and constitutes a functional marker. Except for *Crenothrix* representatives which possess an unusual *pmoA* (Stoecker *et al.*, 2006), the *pmoA* phylogeny is congruent with that of 16S rRNA (Bourne *et al.*, 2001). Therefore this gene is targeted in complement of 16S rRNA or alone for the detection of aerobic methanotrophs in freshwater lakes (Costello and Lidstrom, 1999; Bussmann *et al.*, 2004; Pester *et al.*, 2004; Nercessian *et al.*, 2005; Rahalkar and Schink, 2007; Rahalkar *et al.*, 2009; Tsutsumi *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2011).

III.1.c Examples of environmental factors affecting aerobic methanotrophy in freshwater lakes

Availability of CH₄/O₂

The activity of aerobic methane oxidizing bacteria depends on the availability and concentrations of both CH₄ and O₂. The highest methane consumption rates are located at oxic/anoxic interfaces where opposite fluxes of CH₄ and O₂ occur. In freshwater lakes, these zones are found in the upper layers of sediment overlaid by oxic water and in the oxycline of stratified water columns. A large fraction of CH₄ diffusing from anoxic zone is oxidized at sediment surface (66 – 95 % (Frenzel *et al.*, 1990; Bosse *et al.*, 1993; Liikanen *et al.*, 2002)) and in the water column (45 – 100% (Bastviken *et al.*, 2002)). In several lakes, the activity of

aerobic methanotrophs was found to be highest at the bottom part of the oxycline where high methane concentrations and low oxygen concentrations occur (Patt *et al.*, 1974; Utsumi *et al.*, 1998b; Bastviken *et al.*, 2002; Liikanen *et al.*, 2002; Sundh *et al.*, 2005).

Methane oxidation rates are linked to methane production rates (Sundh *et al.*, 2005; Duc *et al.*, 2010), and high methane availability lead to a rapid increase of the initial methane oxidation rates (Bender and Conrad, 1994). Accordingly, methane consumption rates fluctuate along the year. Utsumi *et al.*, (1998a) found, in a shallow eutrophic lake, that methane consumption rates exhibit a maximum value in the late summer, when the methane production rates is maximum.

Methane accumulated in the anoxic hypolimnion during summer stratification is released in the whole water column during the seasonal overturn events. At this time, the high concentrations of both O₂ and CH₄ in the water column induce an increase of oxidation rates in the overall water column (Utsumi *et al.*, 1998b; Kankaala *et al.*, 2007b). However, a substantial fraction of methane is not oxidized and escapes to the atmosphere during mixing events (Bastviken, 2009).

Temperature

A recent study performed on 8 different freshwater lake sediments from boreal and northern regions found that methane oxidation rates are not directly correlated with temperature (Duc *et al.*, 2010). This finding is in agreement with the low Q₁₀ values (*i.e.* the rate of change of a process as a consequence of increasing temperature of 10°C) of methane oxidation rates obtained for others environments such as forest soil or peat (1.4 – 2.1) (Roslev *et al.*, 1997; Segers, 1998). But, according to the interdependency between rates of methane production and consumption, temperature may have an indirect effect on methane oxidation rates whereas this parameter acts on methane production rates.

Nitrogen

The effect of nitrogen inputs on methanotrophs and on methane oxidation were investigated in freshwater lakes in the context of anthropogenic-accelerated eutrophication (Bosse *et al.*, 1993; Nold *et al.*, 1999; Liikanen and Martikainen, 2003). Addition of ammonium (NH₄⁺) generally inhibits methane oxidation (Bosse *et al.*, 1993; Murase and Sugimoto, 2005) and incorporation of methane-derived carbon into lipids of methanotrophs (Nold *et al.*, 1999). This inhibition is attributed to a competition of NH₄⁺ with CH₄ for the binding sites on the methane monooxygenase, because of their similar chemical structure

(Bedard and Knowles, 1989). The amplitude of the inhibition of methane oxidation is dependent on the concentration of added NH_4^+ (Bosse *et al.*, 1993) and the minimal concentrations which partially inhibit methane oxidation depend on the *in situ* conditions. For example, Bosse *et al.* (1993) found that methane oxidation is inhibited above 4 mM of NH_4^+ while Murase *et al.* (2005) observed a serious inhibition by adding 200 μM of NH_4^+ . In contrast, Liikanen and Martikainen (2003) did not observed any change in the methane emission from the sediment of a eutrophic lake, even at 15 mM of NH_4^+ . Finally, the increase of NH_4^+ concentrations might also enhance methane oxidation rates when NH_4^+ (as nitrogen source for growth of methanotrophs) is limiting (Rudd *et al.*, 1976; Bodelier and Laanbroek, 2004).

Top-down regulation

Depending on local and seasonal conditions, methanotrophic bacteria may represent a substantial fraction of the planktonic and/or benthic biomasses in freshwater lakes (Costello *et al.*, 2002; Bastviken *et al.*, 2003). Numbers of observations led to the hypothesis that a significant fraction of aquatic consumer diets may be comprised of CH_4 -derived carbon. Accordingly, several studies found evidences of carbon transfer as ^{13}C -labeled- CH_4 signal transfer in zooplankton and *Chironomidae* (Kankaala *et al.*, 2006; Deines *et al.*, 2007) or have detected PFLA methylotrophic biomarkers in *Chironomidae* tissues (Kiyashko *et al.*, 2004). This transfer to Metazoa would occur directly or indirectly via the grazing of Protozoa such as amoeba, ciliates, and flagellates (Murase and Frenzel, 2007). Although the efficiency of the microbial transfer of methane in planktonic food web is currently discussed (Jones and Lennon, 2009), grazing pressure may influence CH_4 oxidation rates and methanotrophic community structure (Kankaala *et al.*, 2007a).

III.1.d Composition pattern of aerobic methanotrophs community in freshwater lakes

The aerobic methanotroph community composition was investigated in both water column and sediment of freshwater lakes by PFLA analysis and molecular approaches based on 16S rRNA and *pmoA* sequences (Costello and Lidstrom, 1999; Costello *et al.*, 2002; Dumestre *et al.*, 2002; Nercessian *et al.*, 2005; Sundh *et al.*, 2005; Rahalkar and Schink, 2007; Kojima *et al.*, 2009b; Rahalkar *et al.*, 2009; Taipale *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2010; Tsutsumi *et al.*, 2010; Dumont *et al.*, 2011). These studies found that the family *Methylococcaceae* (type I) dominates the methanotrophic communities inhabiting temperate and boreal lakes ($T^\circ\text{C} < 12^\circ\text{C}$).

Genus	Occurrence in freshwater lakes (%; n = 7)	Fraction of overall methanotroph sequences from freshwater lakes (%; n = 73)
Methylobacter	86%	50,7%
Methylosinus	29%	6,8%
Methylosarcina	29%	4,1%
Methylomonas	14%	4,1%
Methyloferula	14%	5,5%
Not affiliated to any known methanotroph genera	43%	28,8%

Table 6: Occurrence of genera of aerobic methanotrophs and distribution of methanotroph sequences belonging to these genera in freshwater lakes. This analysis, performed on data from 7 freshwater lakes and 73 16S rRNA sequences, was realized as described for methanogens, except that a 96% cutoff was applied for genus affiliation.

For this review, 73 published sequences of 16S rRNA from 7 lakes were analyzed and were affiliated to 6 known genera (Table 6 and Fig. 33). The genus *Methylobacter* (type I) encompassed one half of the sequences and was retrieved in all mid-latitude lakes (Table 6). In contrast, the dominance of methanotrophs affiliated to *Methylocystaceae* (type II) dominate the water column of a tropical dam lake characterized by temperatures comprised between 25 and 30°C (Dumestre *et al.*, 2002).

As postulated by several authors, low temperatures might give an advantage to type I (and inversely for type II) in freshwater lakes (Sundh *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2009b; Tsutsumi *et al.*, 2010). This assumption is supported by results of studies on methanotrophic populations in other systems (a landfill cover soil (Borjesson *et al.*, 2004) and a biofilter on landfill (Gebert *et al.*, 2003)) where low temperatures favor type I whereas both groups or preferably type II populations grew at $\geq 20^{\circ}\text{C}$. Moreover, one third of the 16S rRNA sequences of methanotrophs retrieved from temperate and boreal lakes and analyzed in this review have more than 97 % of similarity with the psychrophilic species *Methylobacter psychrophilus* (Omelchenko *et al.*, 1996) or with the psychrotolerant species *Methylobacter tundripaludum* (Wartiainen *et al.*, 2006) (data not show).

Two type strains of aerobic methanotrophs were isolated from freshwater lakes, *Methylosarcina lacus* (Kalyuzhnaya *et al.*, 2005) and *Methylosoma difficile* (Rahalkar *et al.*, 2007) (Fig. 33). Isolation of strains belonging to type I and II were also reported from various freshwater lakes (Auman *et al.*, 2000; Heyer *et al.*, 2002; Bussmann *et al.*, 2004; Bussmann *et al.*, 2006).

III.2 Anaerobic oxidation of methane

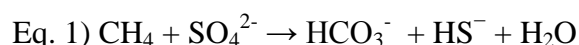
More than 30 years have elapsed since geochemical studies revealed the anaerobic oxidation of methane (AOM) in anoxic marine sediments and waters columns (Martens and Berner, 1974; Barnes and Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976). First reports of the potential occurrence of this process in freshwater lakes followed few years later (Panganiban *et al.*, 1979; Zehnder and Brock, 1980). Nevertheless, the studies on methane consumption in freshwater lakes have rarely focused on AOM. Recently, few studies have reported geochemical, isotopic and biological evidences of AOM in sediment and stratified water column of freshwater lakes (Eller *et al.*, 2005; Wand *et al.*, 2006; Crowe *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 2011) suggesting the possible involvement of this yet poorly knew process in the limitation of methane emissions from freshwater lakes.

Microbial communities and metabolisms involved in AOM are diversified since three different processes were described in various environments. To our knowledge, nitrate dependent methane oxidation (NDMO) was exclusively observed in freshwater environments, whereas sulfate reduction dependent methane oxidation (SDMO) and iron/manganese dependent methane oxidation were reported from both marine and freshwater lakes environments. As the AOM was firstly and mainly investigated in marine sediments, the description of the metabolisms and microorganisms involved in that process refer largely to marine environments in the first part of this section.

III.2.a. AOM coupled to sulfate-reduction (SDMO)

- Discovery of the microorganisms involved

First studies on AOM in natural ecosystems have been carried out in marine sediments (Martens and Berner, 1974; Barnes and Goldberg, 1976; Reeburgh, 1976). In these environments, methane and sulfate concentrations profiles, measured from anoxic sediment to water column, revealed opposite trends. The assumption was formulated that methane is oxidized anaerobically by a consortium between a *Archaea* performing a reversed methanogenesis and a sulfate-reducing bacteria (SRB, Eq. 1) (Zehnder and Brock, 1979; Hoehler *et al.*, 1994).



$$(\Delta_r G^\circ = -17 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4)$$

Different studies from various marine environments detected archaea-specific lipid biomarkers conspicuously depleted in the carbon isotope ^{13}C (Elvert *et al.*, 1999; Hinrichs *et al.*, 1999; Pancost *et al.*, 2000). Sequences of the 16S rRNA gene libraries from these environments revealed that Anaerobic Methanotrophs (ANME) constitute three groups named ANME-1 ; -2 ; -3 which are distantly or closely related to the orders *Methanosarcinales* and *Methanomicrobiales* (Hinrichs *et al.*, 1999; Knittel *et al.*, 2005) (Fig. 32). These ANME groups are not monophyletic, exhibiting sequence similarities of 75–92 %.

Visual identification of cells hybridized with fluorochrome-labeled specific oligonucleotide probes in marine sediments revealed conspicuous aggregates of *Archaea* and SRB (AOM consortia), representing >90 % of the total microbial community (Boetius *et al.*, 2000). This finding supported the hypothesis that methane could be used as a substrate source

via the cooperation of *Archaea* able to activate methane and SRB able to provide an electron sink. SRB associated to ANME-1 and 2 are affiliated to *Desulfosarcina* and *Desulfococcus* whereas ANME-3 is associated to *Desulfobulbus*.

Evidences for a reverse methanogenesis

Besides the close phylogenetic affiliation between ANME and methanogens, evidences for metabolic similarities come from different studies. The *mcrA* gene (coding for the α -subunit of MCR, see section II.2) was shown to be associated to ANME community (Hallam *et al.*, 2003) and metagenomic analyses of ANME rich sediments revealed that nearly all the genes involved in the methanogenesis pathways are present in ANME-1 (Hallam *et al.*, 2004). Proteomic approaches lead to isolation of an abundant enzymatic complex with a high degree of similarity with MCR (Kruger *et al.*, 2003). This complex named Ni-protein I is associated with a modified F₄₃₀ cofactor (172-methylthio-F₄₃₀ (Mayr *et al.*, 2008)) and may be involved in AOM. Recently, Scheller *et al.* (2010) shown that a MCR extract from a methanogen was able to cleave the strong C-H bond of methane to form methyl-coenzyme M. All these data support the hypothesis that anaerobic methane oxidation is performed by a reverse methanogenesis process. Surprisingly, a recent study based on a transcriptomic approach reported evidence about a net methane production by ANME-1 when they are not located in the sulfate-methane transition zone (Lloyd *et al.*, 2011). These findings offer a new perspective on ANME-1 group which could be seen as both producer and consumer of methane.

III.2.b. AOM coupled to denitrification (NDMO)

Environmental evidences of NDMO were first obtained from a freshwater contaminated aquifer containing high nitrate concentrations (Smith *et al.*, 1991). Evidence of this process was later supported by experimental observations (Islas-Lima *et al.*, 2004). Recently, Raghoebarsing *et al.*, (2006) demonstrated AOM coupled to nitrite reduction (Eq. 2) in enrichment cultures obtained from sediments of two freshwater ecosystems with high nitrate concentrations (up to 1 mM).



$$(\Delta_r G^\circ = -928 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4)$$

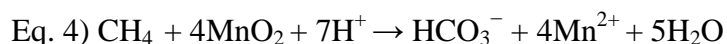
Their enrichment culture was dominated by a new bacterial candidate division called NC10 (Ettwig *et al.*, 2008). An archaeon affiliated to the *Methanosarcinales* (named AAA for AOM-associated *Archaea*, Fig. 32), distantly related to ANME-2 (86–87 %) and to methanogens (86–88 %) was found to form consortia with NC10 members. However this archaeon disappeared after prolonged incubation (Ettwig *et al.*, 2008) suggesting that it was not obligatory involved NDMO. This process driven by members of NC10 appears to be completely different from SDMO since it does not seem to involve a reverse methanogenesis. Complete genome analysis of "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*", the dominant bacterium affiliated to NC10, and isotopic experiments, pointed out a new pathway of 'intra-aerobic denitrification' (Ettwig *et al.*, 2010). This pathway leads to O₂ production by dismutation of 2NO. However the enzyme and genes involve in NO dismutation are not yet clearly identified. Most of the genes involved in the classical pathway of aerobic methanotrophy were retrieved in the genome of "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*". Therefore, the O₂ produced by the NO dismutation should be used to oxidize methane within the same cell. The *pmoA* gene used to investigate aerobic methanotrophy (see section III.1.b) may also constitute a functional marker of the NDMO metabolism (Luesken *et al.*, in press). Even though the environmental significance of this process is still unknown, it might play a significant role in freshwater lakes as the sequences of NC10 were retrieved in different lake sediments (Lake Biwa, Lake Washington and Lake Mystic) (Ettwig *et al.*, 2009).

III.2.c. AOM coupled to iron and manganese reduction

Anaerobic methane oxidation was shown to be coupled with iron and manganese reduction (Eq. 3 and 4) (Beal *et al.*, 2009) in methane-seep sediments. The communities involved are dominated by an uncultivated archaeal group named Marine Benthic Group-D (MBG-D). ANME-1 and 2 were also identified. Considering the measured AOM rates and the global amount of manganese and iron provided by river to continental margins, this process could contribute to a large part of the global anoxic methane oxidation in ocean. However, the process and the identity of microorganisms involved are still unclear.



$$(\Delta_r G^\circ = -572 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4)$$



$$(\Delta_r G^\circ = -790 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ CH}_4)$$

III.2.d. Significance of AOM in some freshwater lake systems

AOM in Lake Plußsee

During summer stratification, in the anoxic hypolimnion of Lake Plußsee, methane and sulfate concentrations exceed 0.5 mM and 300 µM, respectively. Profiles of methane concentration and of $\delta^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ revealed two layers of methane consumption, one located at the bottom part of the oxicle and a second in the anoxic layer suggesting that AOM process occur. In this anoxic layer, ANME cells visualized by catalyst-amplified reporter deposition-FISH, accounted for 0.1 to 1 % for ANME-1 and 0.1 to 0.5 % for ANME-2 of the microbial communities. ANME-1 cells have been visualized as single or short cellular chains whereas ANME-2 cells have been detected in small aggregates. Consortia of ANME with SRB were not detected (Eller *et al.*, 2005).

AOM in Lake Cadagno

Geochemical, isotopic and microbiological investigations performed in the deep sulfidogenic sediment of the meromictic lake Cadagno revealed several evidences of AOM (Schubert *et al.*, 2011). Like in marine sediments, methane and sulfate concentrations display opposite trends with depth. The high $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$ composition and the concomitant occurrence of light precipitated carbonates were indicative of OAM in the uppermost sediment layer. Based on these results, Schubert *et al.* (2011) postulated for a SDMO process but did not exclude the possible involvement of iron and/or manganese reduction in the AOM as low concentrations of these elements were also detected. Surprisingly, ANME were not detected in Lake Cadagno sediments, neither by FISH nor in clone libraries. Whereas nitrate and nitrite were not detectable, five sequences of AAA were retrieved in the uppermost sediment and were observed to form monospecific aggregates. This result suggests that AAA might be associated to several different AOM processes.

- AOM in Lake Matano

The monimolimnion of Lake Matano, a deep meromictic lake, exhibits high methane concentrations (up to 1.5 mM). Comparatively to Lake Plußsee and Lake Cadagno, methane concentration and isotopic variation of $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ and $\delta^{13}\text{C-CO}_2$ indicate that methane is oxidized under anaerobic conditions (Crowe *et al.*, 2010). High Fe(III) and Mn(IV) concentrations and low SO_4^{2-} and NO_3^- concentrations suggest that AOM is coupled to iron/manganese reduction, but microorganisms involved in this process are not yet identified (Beal *et al.*, 2009).

III.2.e The putative biogeochemical role of AAA: methanotroph or methanogen?

Sequences of AAA have been retrieved from various environments including freshwater sediments or water column from Lake Michigan (Stein *et al.*, 2001), Cadagno (Schubert *et al.*, 2011), Llebrete (Auguet *et al.*, 2011), Siggeforasjön (Gantner *et al.*, 2011), and Honghu (HM244267 Zheng, S. and Fang, Z. unpublished data). The metabolic capacity of this group, as putative methanotroph or methanogen, is discussed (Ettwig *et al.*, 2008; Knittel and Boetius, 2009). The arguments in favor of a methanotrophic lifestyle are: 1) they are encountered in environments where AOM processes occur (Raghoebarsing *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2011), 2) members of AAA possess a *mcrA* gene related to the *mcrA* group e (attributed to ANME-2a), 3) the carbon isotopic signature of their lipids is highly depleted in ^{13}C (-67 ‰) in comparison with methane supplied in a NDMO enrichment (-20 ‰) (Ettwig *et al.*, 2008). In a NDMO reactor containing NC10 and AAA, it was also suggested that AAA members assimilate ^{13}C from labeled methane in their lipids (Raghoebarsing *et al.*, 2006). However, this assimilation was minor in comparison to the assimilation in bacterial lipids, and it was then suggested that AAA might be a methanogenic group which use ^{13}C -labeled waste products or intermediates as substrates (Ettwig *et al.*, 2008). This putative methanogenic lifestyle is supported by the close affiliation of *mcrA* and 16S rRNA sequences of AAA to ZC-I group sequences, a recently described methanogenic group which is able to use methanol, acetate, hydrogen and trimethylamine as substrates (Zhang *et al.*, 2008)). Indeed, the *mcrA* gene of AAA and ZC-I groups (EU495303 and EU275991 respectively) exhibits 97% similarity on a nucleotide level and their 16S rRNA (DQ369741 and EU283010 respectively), that cannot be compared directly because of their low overlying sequence, exhibit 99% similarity with a sequence retrieved from a rich minerotrophic fen

(EU155958 in (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2008)). On the basis of this affiliation, AAA members might also be methanogens able to grow on “noncompetitive substrates” (see section II.2) explaining why they are encountered in zones where alternative electron acceptors (sulfate, iron, nitrate, etc) are not depleted, such as AOM zones. Methylophilic methanogens are known for their remarkably high isotopic fractionation during lipid biosynthesis (Summons *et al.*, 1998), this could explain the depleted carbon isotopic signature of AAA lipids. Finally, as proposed recently for ANME-1 groups (Lloyd *et al.*, 2011) it could not be excluded that AAA members might be able to shift between methanogenic and methanotrophic lifestyle.

Conclusion

The communities involved in methanogenesis and methanotrophy are generally dominated by the same genera in the freshwater lakes investigated so far. The most commonly encountered methanogens are affiliated to the hydrogenotrophic *Methanoregula* genus and to the acetoclastic *Methanosaeta* genus, and the genus *Methylobacter* dominates the aerobic methanotrophic communities. However, these communities were mainly detected in the deep water layers and sediments of mid-latitude lakes and are not necessarily representatives of communities inhabiting shallow sediments and inter-tropical lakes. Identifying communities involved in the biogeochemical methane cycle in these ecosystems is critical since the average methane emissions from tropical freshwater lakes (2023 mmol/m²/yr) is higher than from boreal (331 mmol/m²/yr) and temperate lakes (1110 mmol/m²/yr) and that methane emissions from shallow sediments would represent a major part of methane emissions from freshwater lakes (Bastviken, 2009).

The aerobic methane oxidation is a very efficient process for consuming the methane diffusing through the anoxic/oxic boundary of freshwater lakes. As methanotrophic rates are regulated by methane availability, the seasonal increase of methane production is partially counterbalanced by the increase of methane consumption. However, methane accumulated in anoxic zone and transported to the atmosphere by bubbling or plant mediated flux is inaccessible to aerobic methane oxidizers. Therefore, by decreasing the methane concentrations in anoxic zones, the AOM process might play a significant role in the control of methane emission from freshwater lakes. A microorganism involved in the NDMO ("*Candidatus Methylophilus oxyfera*") was recently identified in a freshwater system and

its associated original metabolism was partially described. However, its contribution as a methane sink in freshwater lakes has not been yet evaluated. Strong geochemical evidences suggest that others AOM processes (SDMO and the iron/manganese dependent methane oxidation) occur in freshwater lakes. However the communities involved in these processes in freshwater lakes are not yet clearly identified. Notably, ANME groups involved in the SDMO process in marine environments were only identified once by FISH in the AOM zone of Lake Plußsee but no evidence of their occurrence was reported from AOM zone of other freshwater lakes suggesting that unidentified actors of AOM remain to discover.

Acknowledgements

We thank all the participants of the project INTERLAC. We also thank Brigitte Arbeille and Claude Lebos for electron micrographs. This study was financed by EC2CO, a French national program led by Institut National des Sciences de l'Univers (INSU), (CNRS). Guillaume Borrel benefited of a PhD grant from the Region Auvergne in the Programm « Environnement » (PREVOIR).

PRESENTATION DU SITE D'ÉTUDE

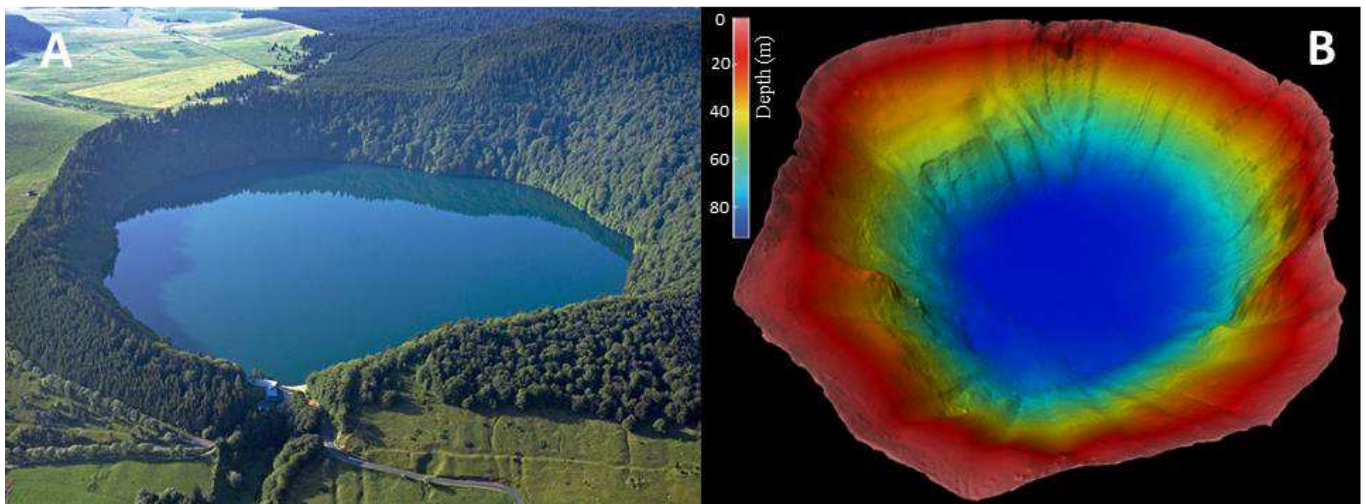
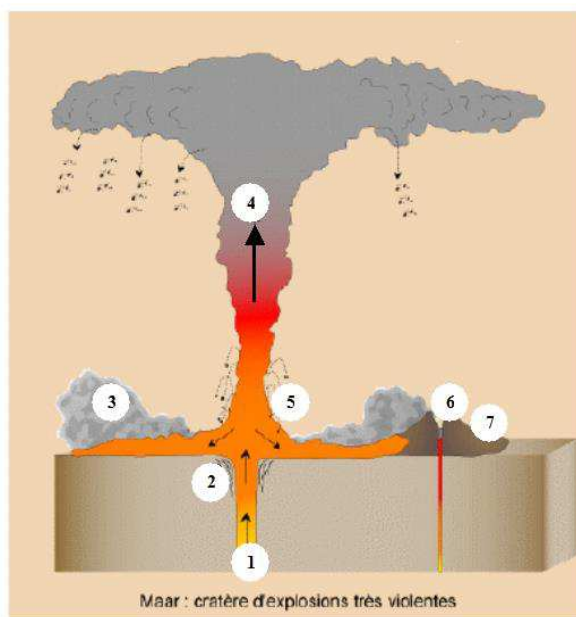


Figure 1 : A) Photographie aérienne du Lac Pavin (Photo : Joel Damase). B) Carte bathymétrique du Lac Pavin, d'après Chapron *et al.*, (2010).



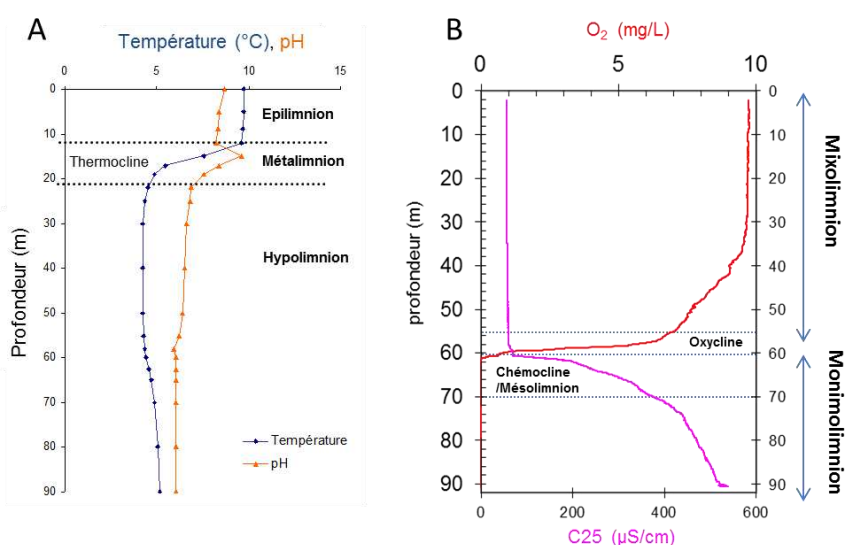
- 1 - explosion profonde lors de la rencontre du magma avec une nappe phréatique ou une rivière souterraine
- 2 - colonne explosive maintenue sous pression dans un conduit cylindrique.
- 3 - déferlante basale.
- 4 - la colonne éruptive s'élève verticalement mais son manchon externe décomprimé s'écroule, engendrant autour de l'orifice une déferlante basale horizontale.
- 5 - projectiles balistiques.
- 6 - obstacle (volcan antérieur) bloquant la progression de la déferlante.
- 7 - zone dite "à l'ombre".

Figure 2 : Formation d'un cratère de maar

I- Origine et méromicticité du Lac Pavin

Le Lac Pavin est situé en Auvergne, dans la partie méridionale de la Chaîne des Puys, à une altitude de 1197 m. De forme quasi circulaire, ce lac oligo-mésotrophe est logé dans un cratère de maar dont la formation est datée entre 6900 et 7000 ans cal BP²³ (Fig. 1, (Chapron *et al.*, 2010)). Ce type de cratère se forme lorsque du magma remontant vers la surface rencontre une nappe phréatique ou une rivière souterraine (Fig. 2). L'augmentation soudaine de la pression liée à la vaporisation de l'eau engendre une violente explosion et l'expulsion de la roche sus-jacente. Cette origine phréato-magmatique confère au Lac Pavin des caractéristiques particulières qui ont engendré une stratification permanente de sa colonne d'eau en 2 couches qui ne se mélangent pas : le mixolimnion et le monimolimnion (Fig. 3). Plusieurs éléments pourraient entretenir et/ou être à l'origine du brassage incomplet de la colonne d'eau du Lac Pavin : (i) sa forte valeur de creux²⁴, (ii) la structure très fermée de son bassin versant qui réduit la course du vent à sa surface, (iii) la densité de l'eau de la couche profonde, supérieure à celle de la couche sus-jacente, et (iv) la présence de sources sous-lacustres potentiellement situées à 53 m et 68 m de profondeur (Jézéquel *et al.*, in preps.). Cette stratification permanente, très atypique et uniquement partagée par quelques lacs en Europe (Meybeck, in preps.), classe le Lac Pavin parmi les lacs méromictiques. La période d'installation de la méromicticité, au cours du siècle dernier (Meybeck, in preps.) ou quelques centaines d'années après la mise en place du lac (Jézéquel *et al.*, in preps.), est encore débattue.

Figure 3 : A) Profils de température et de pH établis au point central du Lac Pavin en mai 2002, données de N. Assayag (2003) indiquant les zones définies par la stratification thermique (épilimnion, thermocline, hypolimnion). B) Profils d'oxygène dissous et de conductivité (normalisé à 25°C) définissant la stratification chimique (mixolimnion, chémocline ou mésolimnion, monimolimnion).



²³ Calibrated years Before Present.

²⁴ Profondeur maximale/surface^{1/2}, la valeur de creux du Lac Pavin (0,14) est la plus élevée des lacs d'Auvergne. Pour comparaison : Lac Chauvet 0,09 ; Lac de la Godivelle 0,12 ; Gourd de Tazenat 0,13.

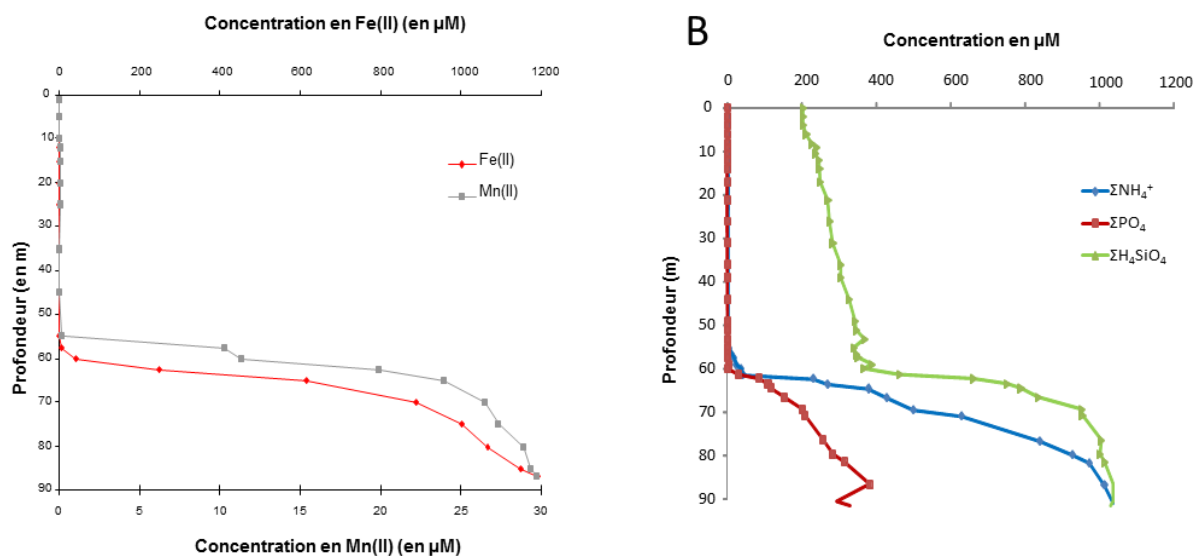


Figure 4 : A) Concentrations en Fe(II) et Mn(II) et B) concentration en NH_4^+ , PO_4 et H_4SiO_4 dans la colonne d'eau du Lac Pavin en juin 2006 (mission MX-3, données non publiées, IPGP et Université Paris 7)

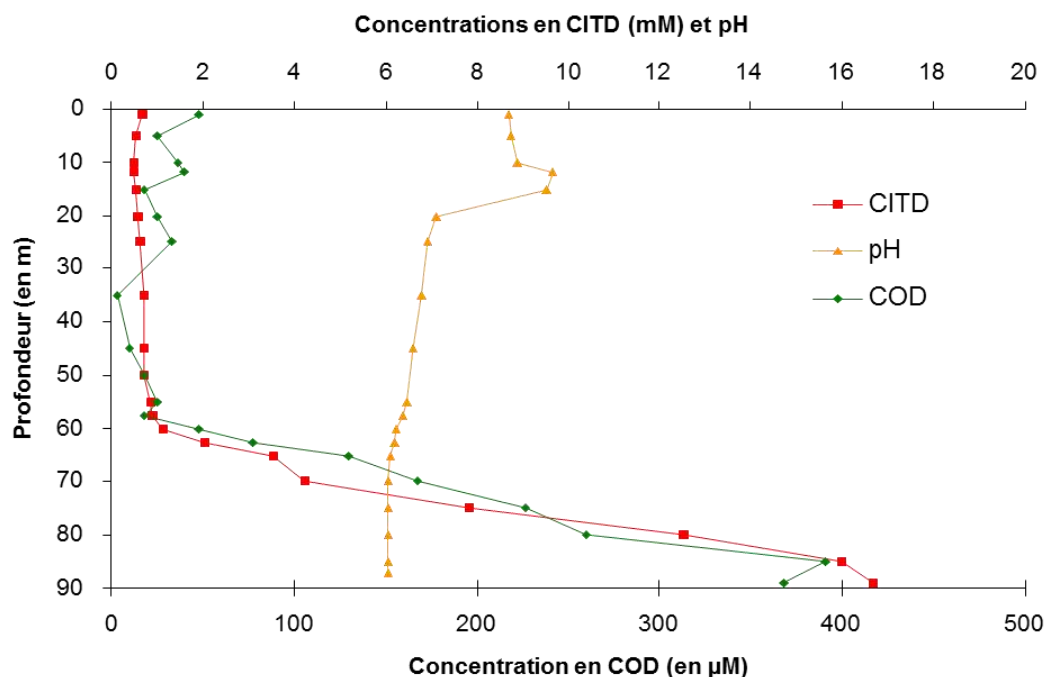


Figure 5 : Profils des concentrations en Carbone Organique Dissous (COD), Carbone Inorganique Total Dissous (CITD). $\text{COD} = \text{COTD} - \text{CITD}$. COTD= Carbone organique total dissous). Les concentrations sont exprimées en μM pour le COD, en mM pour le CITD. Les mesures de COD sont issues de la publication de Viollier *et al.* (1995), celles de CITD ont été réalisées par N. Assayag (2003).

II- Caractéristiques de la colonne d'eau

II.1. Répartition des composés chimiques

Les couches d'eau supérieure (mixolimnion) et inférieure (monimolimnion) possèdent des propriétés biogéochimiques extrêmement contrastées. Le temps de résidence de l'eau dans le mixolimnion est de 15 années (Viollier *et al.*, 1997) et de 70 à 90 années dans le monimolimnion (Assayag *et al.*, 2008; Jézéquel *et al.*, in preps.). L'oxycline et le mésolimnion (Fig. 3B), qui constituent les interfaces entre ces compartiments, présentent d'importants gradients physico-chimiques. Entre la partie supérieure de l'oxycline et la partie inférieure du mésolimnion, la concentration des composés réduits (Fe^{2+} , Mn^{2+} , sulfures, ammonium (Fig. 4A et B), alcalins et alcalino-terreux augmente fortement (Michard *et al.*, données non publiées) et, parallèlement, les composés oxydés (O_2 , sulfate, nitrate) disparaissent. Plusieurs composés tels que le fer, le phosphore (PO_4), la silice (SiO_2), l'azote (NH_4^+) sont fortement concentrés dans la zone anoxique permanente (Fig. 4B). Le monimolimnion se distingue aussi du mixolimnion par ses fortes concentrations en matière organique dissoute, carbone inorganique dissous (DIC) et CH_4 (Fig. 5 et 6).

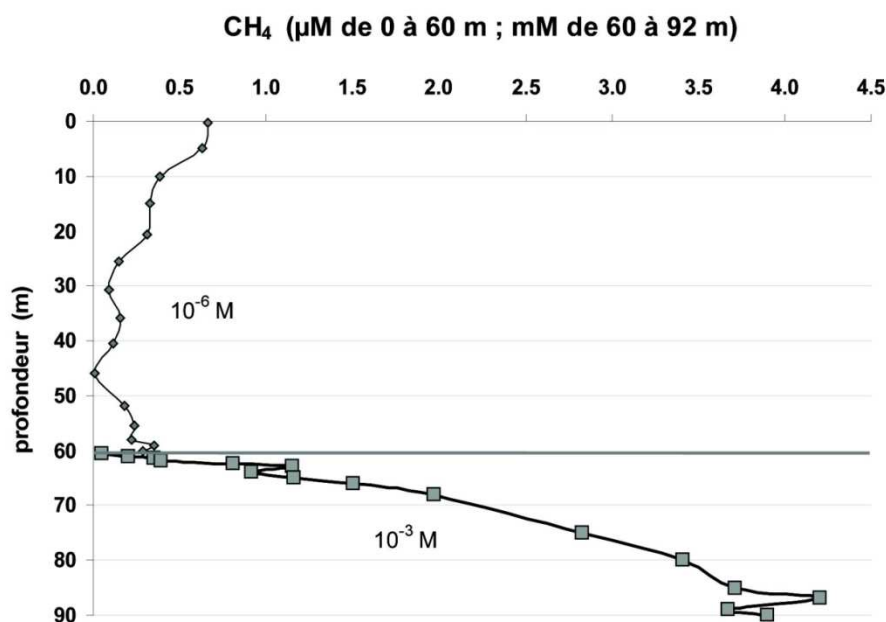


Figure 6 : Profil de méthane en juin 2006, d'après Jézéquel *et al.*, (in preps.).

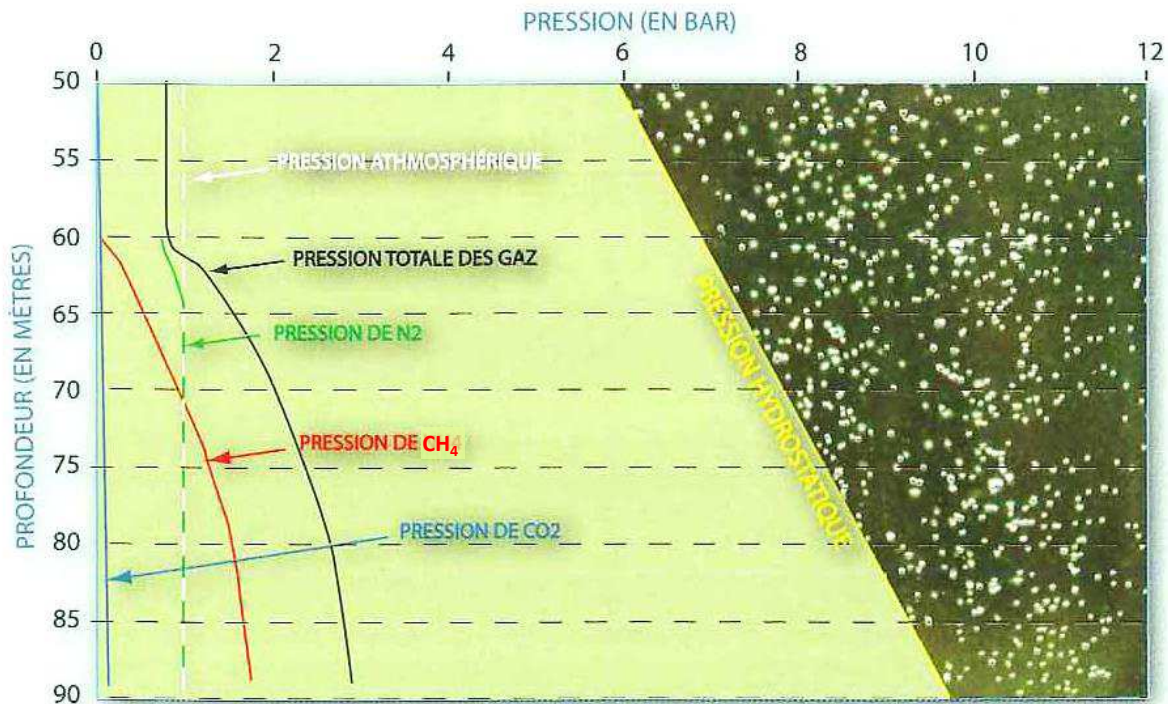


Figure 7 : Pression des gaz dissous dans le Lac Pavin en fonction de sa profondeur, d'après Michard (2010).

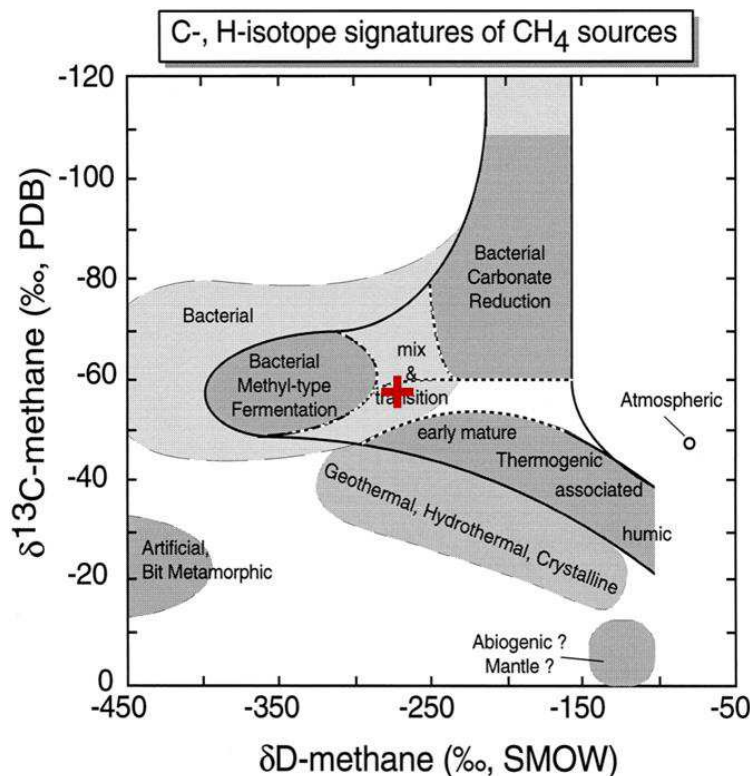


Figure 8 : Classification de l'origine biologique ou thermogénique par combinaison des données isotopiques sur la composition en ^{13}C - CH_4 et D - CH_4 , d'après Whiticar (1999). La croix rouge correspond à la signature isotopique du méthane dans le monimolimnion du Lac Pavin (Agrignier *et al.*, Données non publiées).

II.2. Le méthane dans la colonne d'eau

II.2.a. Profil de concentration et émissions

Les concentrations en méthane sont de l'ordre du micromolaire à 60 m de profondeur et atteignent 4 mM à 92 m de profondeur (Fig. 6). Le contenu en méthane du monimolimnion est d'environ 260 tonnes (Jézéquel *et al.*, 2010). Les fortes concentrations en méthane ainsi que les concentrations importantes en CO₂ (16 mM à 92 m) ont soulevé des interrogations quant à la possibilité d'une éruption gazeuse spontanée comme celle ayant eu lieu dans le lac Nyos (Cameroun) (Aeschbach-Hertig *et al.*, 1999). Cependant, la pression partielle des gaz dissous dans cette zone est trois fois inférieure à la pression hydrostatique de ces profondeurs (Fig. 7), de plus les mesures répétées ces dernières années et la modélisation du cycle du carbone dans le lac montrent que ces concentrations sont stables (Jézéquel *et al.*, 2010; Michard, 2010). En conséquence, aucune éruption gazeuse spontanée ne semble envisageable dans le Lac Pavin, seul un important glissement de terrain perturbant fortement la stratification du lac pourrait engendrer un dégazage partiel (Chapron *et al.*, 2010).

Les plus faibles concentrations en méthane, proches de la limite du seuil de détection de 3 nM, ont été mesurées à 45 m de profondeur (Fig. 6). Au-dessus, les concentrations en méthane augmentent jusqu'à la surface. Les concentrations en méthane dans l'eau superficielle étant supérieures à l'équilibre avec l'atmosphère, du méthane est émis par le lac. Ces émissions, mesurées à l'aide d'une chambre flottante et d'une sonde SPIRIT (Guimbaud *et al.*, 2011), ont été estimées à environ 60 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{j}^{-2}$ (Guimbaud *et al.*, soumis), soit deux ordres de grandeur en dessous de l'émission moyenne des lacs tempérés (Bastviken, 2009). Ainsi, en dépit des fortes quantités de méthane présentes dans la zone profonde, le Lac Pavin émet très peu de méthane.

II.2.b. Origine et consommation du méthane : données isotopiques

Les valeurs de $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ et de $\delta\text{D-CH}_4$ dans le monimolimnion sont respectivement de -60‰ et de -276‰ (Agrinier *et al.*, données non publiées), et indiquent que le méthane de cette zone a une origine biologique et non géothermique ou magmatique (Fig. 8, (Whiticar, 1999)). L'analyse de la signature isotopique du méthane suggère qu'il est principalement produit à partir de méthanogenèse acétoclaste et dans une moindre mesure à partir de la méthanogenèse hydrogénotrophe (Fig. 8). Le méthane situé à 58 m de profondeur est beaucoup plus enrichi en $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ (-39‰) que le méthane du monimolimnion indiquant qu'il est oxydé dans cette zone. En effet, le métabolisme mis en œuvre dans l'oxydation du méthane

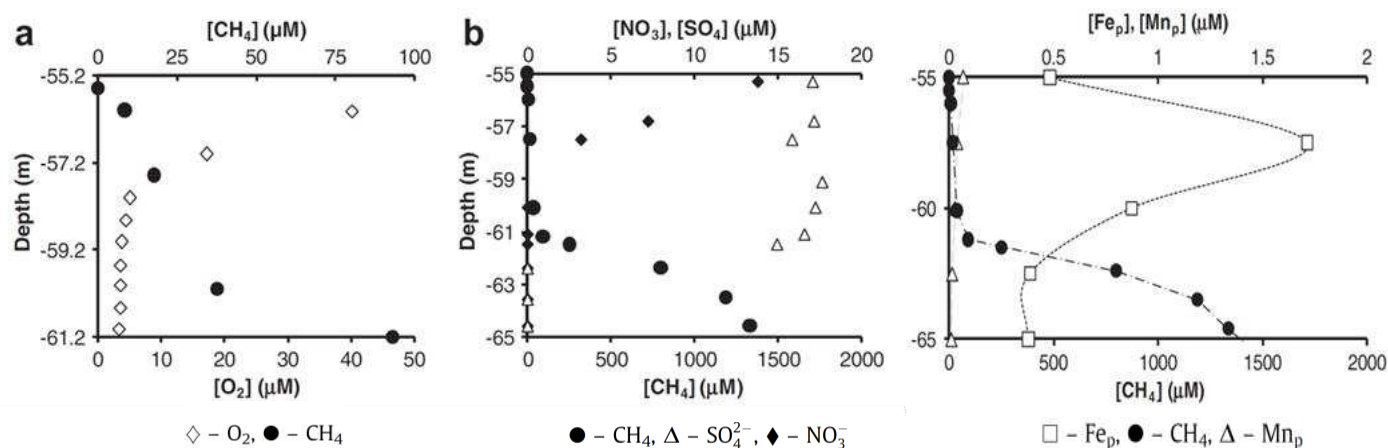


Figure 9 : Recouvrement des profils de concentration en (A) méthane et O₂, (B) méthane et NO₃⁻, SO₄²⁻ (juin 2006), (C) méthane et fer et manganèse particuliers (Septembre 1993), d'après Lopes *et al.*, (2011).

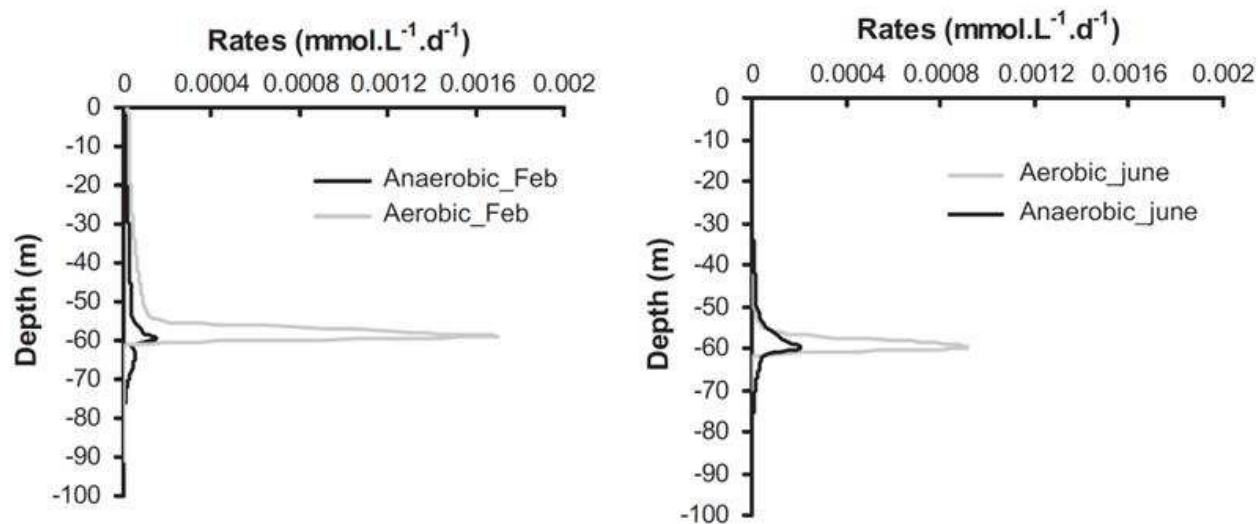


Figure 10 : Modélisation des taux d'oxydation aérobie et anaérobie du méthane pour février et juin 2007, d'après Lopes *et al.*, (2011).

utilise préférentiellement le $^{12}\text{C-CH}_4$, induisant un enrichissement en $^{13}\text{C-CH}_4$ du méthane résiduel. En raison de ce fractionnement et des faibles valeurs initiales de $\delta^{13}\text{C-CH}_4$ (-60‰), le CO_2 produit lors de la méthanotrophie est très appauvri en $^{13}\text{C-CO}_2$, ce qui expliquerait vraisemblablement les faibles valeurs de $\delta^{13}\text{C-DIC}$ (\approx -6‰, les plus faibles de la colonne d'eau) mesurées à 58 m de profondeur (Assayag *et al.*, 2008).

II.2.c. Voies d'oxydation du méthane dans la colonne d'eau : approche de modélisation

Les profils de concentration du méthane et de différents accepteurs d'électrons potentiellement impliqués dans son oxydation montrent des zones de superposition suggérant que cette dernière pourrait avoir lieu en aérobie et en anaérobie (Fig. 9, (Lopes *et al.*, 2011)). Un modèle de transport réactif du méthane a été récemment développé afin d'évaluer la part des processus d'oxydation aérobie et anaérobie du méthane dans la colonne d'eau du Lac Pavin (Lopes *et al.*, 2011). Ce modèle montre qu'une oxydation anaérobie du méthane impliquant les oxydes de fer, le sulfate et le nitrate est théoriquement possible et pourrait représenter jusqu'à 33% de la consommation totale du méthane. La part relative de l'oxydation aérobie et de l'oxydation anaérobie pourrait varier saisonnièrement (Fig. 10). En effet, l'oxydation anaérobie représenterait une part plus importante de la consommation du méthane en période de stratification thermique (33%) qu'en période de brassage (26%). La principale voie d'oxydation anaérobie ferait intervenir le nitrate, à 60 m, et représenterait 21 à 27 % de l'oxydation totale (Fig. 11).

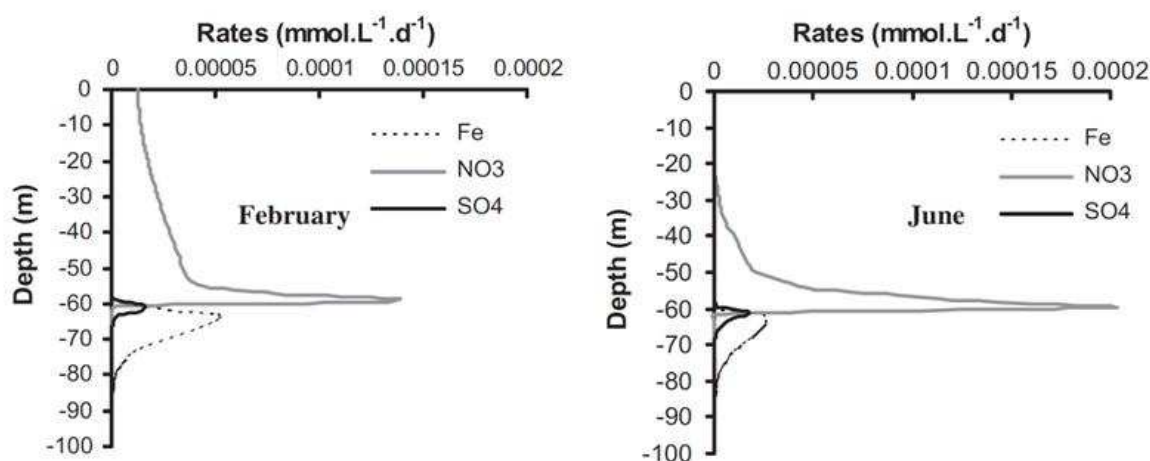


Figure 11 : Modélisation des taux d'oxydation anaérobie du méthane couplé au fer, nitrate et sulfate, pour février et en juin 2007, d'après Lopes *et al.*, (2011).

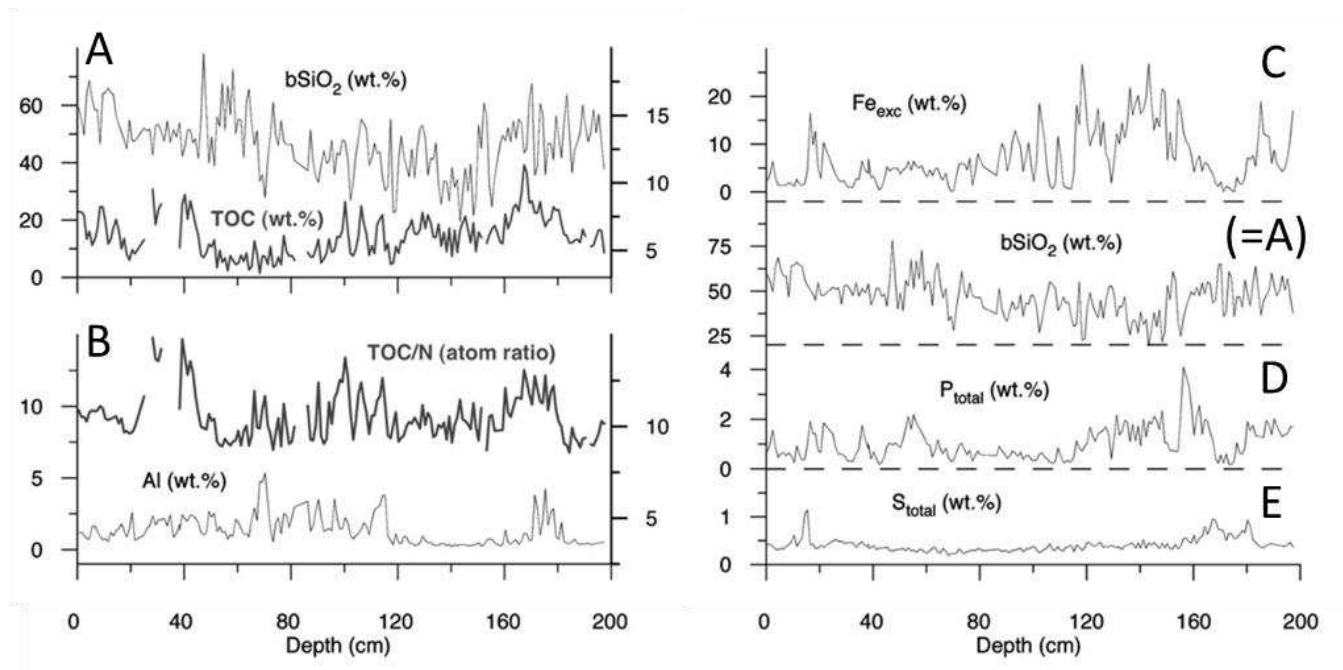


Figure 12 : Contenu en silice d'origine diatomique et en TOC (A), ratio TOC/N et contenu en aluminium (B), contenu en fer (C), phosphore (D), soufre (E) du sédiment profond (92 m) en 1999, d'après Schettler et al., (2007).

Les oxydes de fer n'interviendraient que dans une moindre mesure, autour de 65 m et ne représenteraient que 4 à 5 % de l'oxydation totale (Fig. 12). En période de brassage du mixolimnion, les flux de méthane dans le mixolimnion seraient plus importants, engendrant une augmentation de l'oxydation de ce gaz dans ce compartiment mais également une augmentation des émissions de méthane vers l'atmosphère. Le modèle développé par Lopes *et al.*, (2011), prévoit néanmoins que les émissions moyennes de méthane correspondraient à moins de 10% de sa consommation biogéochimique. Il est possible que le méthane détecté au-dessus du minimum de concentration (45 m, Fig. 6) ne provienne pas du monimolimnion mais des sédiments du mixolimnion (Bastviken *et al.*, 2004; Jézéquel *et al.*, 2010). Dans ce cas, la quasi-totalité du méthane émis par le lac en période de stratification proviendrait des sédiments du mixolimnion et non de ceux du monimolimnion.

III- Caractéristiques des sédiments profonds

En comparaison des données sur la colonne d'eau, les données disponibles sur le sédiment sont beaucoup plus éparées. Les caractéristiques de l'eau interstitielle du sédiment (pH, alcalinité, composition en ions dissous) ont été mesurées en 1995 sur une profondeur de 60 cm (Viollier *et al.*, données non publiées). Suite à un carottage réalisé en 1999, des données sur la composition de la fraction solide, la porosité (en moyenne 0,934) et le taux de sédimentation annuel moyen ($3,5 \pm 0,16 \text{ mm.an}^{-1}$) sur une profondeur de 2 m (Stebich *et al.*, 2005; Schettler *et al.*, 2007) ont été acquises. Enfin, un carottage effectué en décembre 2007 a permis d'évaluer les concentrations en méthane sur une profondeur de 35 cm (Jézéquel *et al.*, données non publiées et Assayag *et al.*, 2008).

III.1. Origine et composition des particules sédimentaires

Les caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau influent sur la nature des particules sédimentant et sur leur transformation dans le sédiment. Dans le Lac Pavin, les particules sédimentaires sont riches en fer et en silice biogénique (frustules de diatomées). L'anoxie permanente de la zone pélagique profonde favorise l'accumulation de fer ferreux et de matière organique.

III.1.a. La silice

Le taux de sédimentation est variable au cours de l'année, et atteint un pic au printemps lors de la sédimentation des diatomées (Viollier *et al.*, 1997). Le développement de ces algues est

fortement stimulé dans le Lac Pavin en raison de l'apport important de silice par certaines sources alimentant le lac (Jézéquel *et al.*, in preps.). L'accumulation de ces frustules au niveau du sédiment constitue une caractéristique singulière. Plus de 100 espèces appartenant à 24 genres différents ont été identifiées dans le sédiment (Stebich *et al.*, 2005). Les changements de composition de ces espèces avec la profondeur renseignent sur l'évolution des conditions climatiques et de la pression anthropique au voisinage du lac au cours des 700 dernières années (Stebich *et al.*, 2005). La silice qui compose les frustules représente entre 20 et 70 % de la masse sèche totale suivant les profondeurs (Fig. 12, (Schettler *et al.*, 2007)).

III.1.b. Le fer particulière

Dans la colonne d'eau, le cycle du fer implique la formation de particules de fer oxydé et réduit. Il a été proposé que des particules de fer ferrique, riche en PO_4 , formées dans la partie inférieure de l'oxycline, sédimentent jusqu'à la surface des sédiments où elles seraient réduites et re-solubilisées (Michard *et al.*, 1994). Contrairement aux particules de fer ferrique, les particules de fer réduit (pyrite (FeS_2), protovivianite ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$) et sidérite (FeCO_3)) ne peuvent être solubilisées aux conditions présentes dans les sédiments du monimolimnion. Les particules de fer ferreux accumulées dans les sédiments peuvent représenter une part importante de celui-ci (2 à 25 wt. %) (Schettler *et al.*, 2007).

III.1.c Le carbone organique

Les sédiments du monimolimnion contiennent de fortes concentrations en carbone organique (4 à 9 wt. %), caractéristiques de sédiments surmontés par une couche d'eau en anoxie permanente. En effet, la dégradation de certains composés peu labiles de la matière organique est fortement ralentie, voir stoppée, en absence d'oxygène (Burdige, 2007). Le ratio COT^{25}/N fluctue entre 7,5 et 15. Les pics de COT/N correspondent probablement aux apports de matière organique terrigène qui possède un ratio C/N plus élevé que le phytoplancton (Schettler *et al.*, 2007). La labilité de la matière organique terrigène est généralement plus faible que celle issue de la production phytoplanctonique.

²⁵ COT : carbone organique total. Comprend le carbone organique dissous et particulaire.

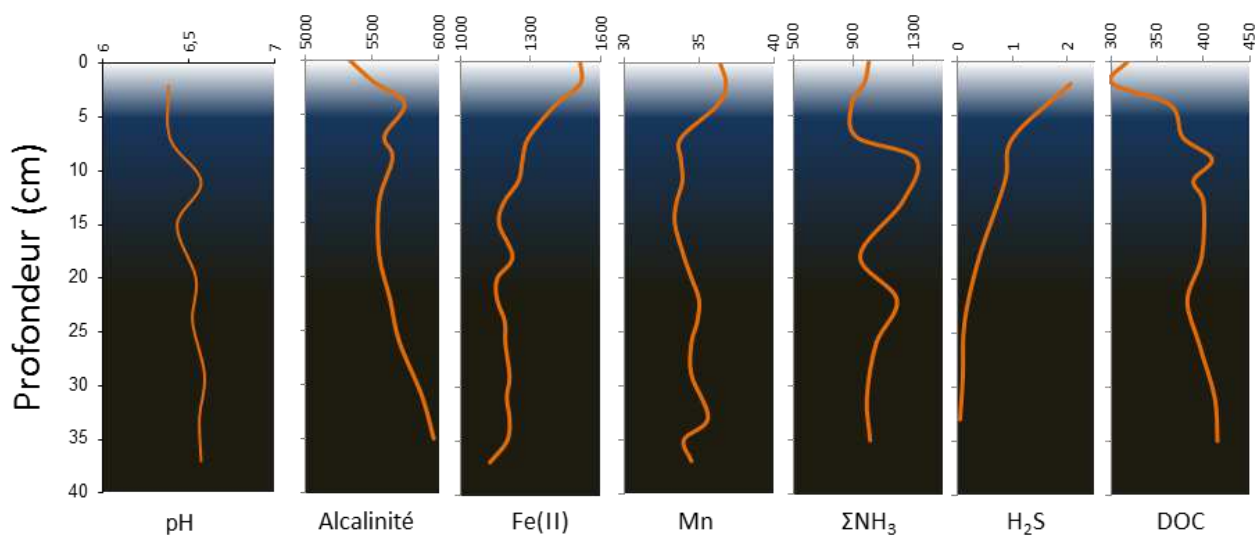


Figure 13 : Caractéristiques (pH, alcalinité, concentration (μM) en fer réduit (Fe(II)), en manganèse (Mn), en ammonium (NH_4), en hydrogène sulfuré (H_2S) et carbone organique dissous (DOC)) de l'eau interstitielle du sédiment profond (92 m) en 1995, d'après Viollier *et al.*, (données non publiées).

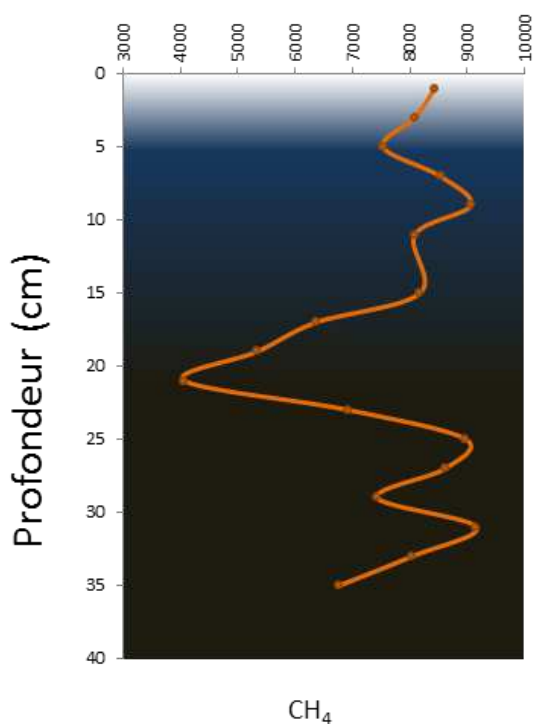


Figure 14 : Concentration en méthane dissous (en μM) dans le sédiment profond (92 m) en décembre 2007, d'après Jézéquel *et al.*, (données non publiées).

III.2. Caractéristiques physicochimiques de l'eau interstitielle

Entre la surface et 35 cm de profondeur, le pH du sédiment, légèrement acide, augmente faiblement (de 6,4 à 6,6) (Fig. 13, Viollier *et al.*, données non publiées). Une augmentation des concentrations en carbone organique dissous (de 320 μM à 415 μM) est également notée. Les concentrations en fer ferreux et en hydrogène sulfuré diminuent entre la surface (1500 μM et 2 μM , respectivement) et 35 cm de profondeur (1100 μM et 0 μM , respectivement).

III.3. Le méthane dans les sédiments

Les concentrations en méthane du sédiment fluctuent entre 4 mM et 9 mM (Fig. 14, Jézéquel *et al.*, données non publiées). Le profil de méthane suggère une consommation de ce métabolite entre 17 cm et 23 cm (Fig. 14). La concentration moyenne du méthane dans le sédiment (7,7 mM) est plus élevée que dans la colonne d'eau anoxique. Le modèle développé par Lopes *et al.*, (2011) suggère que 90 % du méthane du lac serait formé au niveau des sédiments.

IV- Etudes microbiologiques

Depuis une vingtaine d'années, le mixolimnion du Lac Pavin a fait l'objet de nombreuses études visant à identifier, à quantifier et à modéliser l'impact des microorganismes dans les flux de matière et d'énergie (en particulier au sein de la boucle microbienne) dans les écosystèmes aquatiques (Amblard *et al.*, 1992; Jamet *et al.*, 1997; Maurin *et al.*, 1997; Boucher *et al.*, 2006; Lemarchand *et al.*, 2006; Lepere *et al.*, 2006; Lefevre *et al.*, 2007; Rasconi *et al.*, 2009; Arnous *et al.*, 2010). L'importance des virus en tant qu'agent de mortalité et de structuration de la communauté microbienne de ce compartiment a également été considérée (Bettarel *et al.*, 2002; Bettarel *et al.*, 2004; Jardillier *et al.*, 2005; Colombet *et al.*, 2006; Colombet *et al.*, 2009).

Dans le cadre de cette synthèse, seuls les principaux résultats des études menées sur le compartiment anoxique seront présentés. Ces études ont porté sur la zone anoxique pélagique, et, à notre connaissance, aucune étude d'écologie microbienne n'a été menée sur la composante biologique des sédiments du monimolimnion.

IV.1. Implication de la communauté procaryote dans le cycle du soufre, du fer et du méthane

Bien que les études physico-chimiques et géochimiques aient souligné l'originalité de la zone profonde, la communauté microbienne de cet environnement est longtemps restée inexplorée. Suite aux premières approches microbiologiques, qui visaient à déterminer l'origine (biogénique et/ou tellurique) de l'H₂S présent au niveau de la chemocline (Champiat, 1976; Amblard, 1983), aucune investigation sur la composante biologique de cette zone profonde n'a été conduite durant plus d'une vingtaine d'années. A partir de 2002, des études visant à déterminer la composition, la structure et les rôles dans les cycles biogéochimiques des communautés procaryotiques de ce compartiment ont été initiées (Lehours *et al.*, 2005 ; 2007 ; 2009 ; 2010). Les résultats de ces études ont révélé que, bien que l'anoxie contraigne fortement la décomposition de la matière organique, l'abondance des procaryotes est plus élevée dans le monimolimnion ($\approx 8 \times 10^6$ proc/ml ; Lehours *et al.*, 2005) que dans le mixolimnion (4×10^6 proc/ml ; Lemarchand *et al.*, 2006). Un fort particularisme des communautés anaérobies a également été souligné, à l'échelle du lac (61% des phylotypes bactériens et 67% des phylotypes archéens sont propres au monimolimnion) et à une l'échelle globale (plus de 70% des séquences bactériennes ont moins de 93% de similarité avec les séquences présentes dans les banques de données internationales telle que NCBI) (Lehours *et al.*, 2007).

IV.1.a. La communauté bactérienne

La communauté bactérienne du monimolimnion est dominée par des espèces affiliées aux *δ-Proteobacteria*, aux *Verrucomicrobia*, aux *Bacteroidetes* et à la division Candidate OP11²⁶ (Fig. 15), (Lehours *et al.*, 2007)). Cette dernière division, ainsi que deux divisions candidates phylogénétiquement proches (OD1 et SR1)²⁷ ont été plus particulièrement ciblées (Borrel *et al.*, 2010) en raison de leur rôle putatif dans le cycle biogéochimique du soufre (Davis *et al.*, 2009). Si les résultats obtenus par Borrel *et al.*, (2010) sont en accord avec l'implication de la division SR1 dans la réduction dissimilatrice des sulfates, d'autres groupes taxonomiques semblent également participer à la réduction de cet élément, en particulier des bactéries affiliées aux *δ-Proteobacteria*, très abondantes dans la chémocline (Lehours *et al.*, 2005; Lehours *et al.*, 2009). Cependant, en raison de la versatilité métabolique des sulfato-

²⁶ OP11 : Obsidian Pool 11

²⁷ OD1 : OP11-Derived 1 ; SR1 : Sulfur River 1

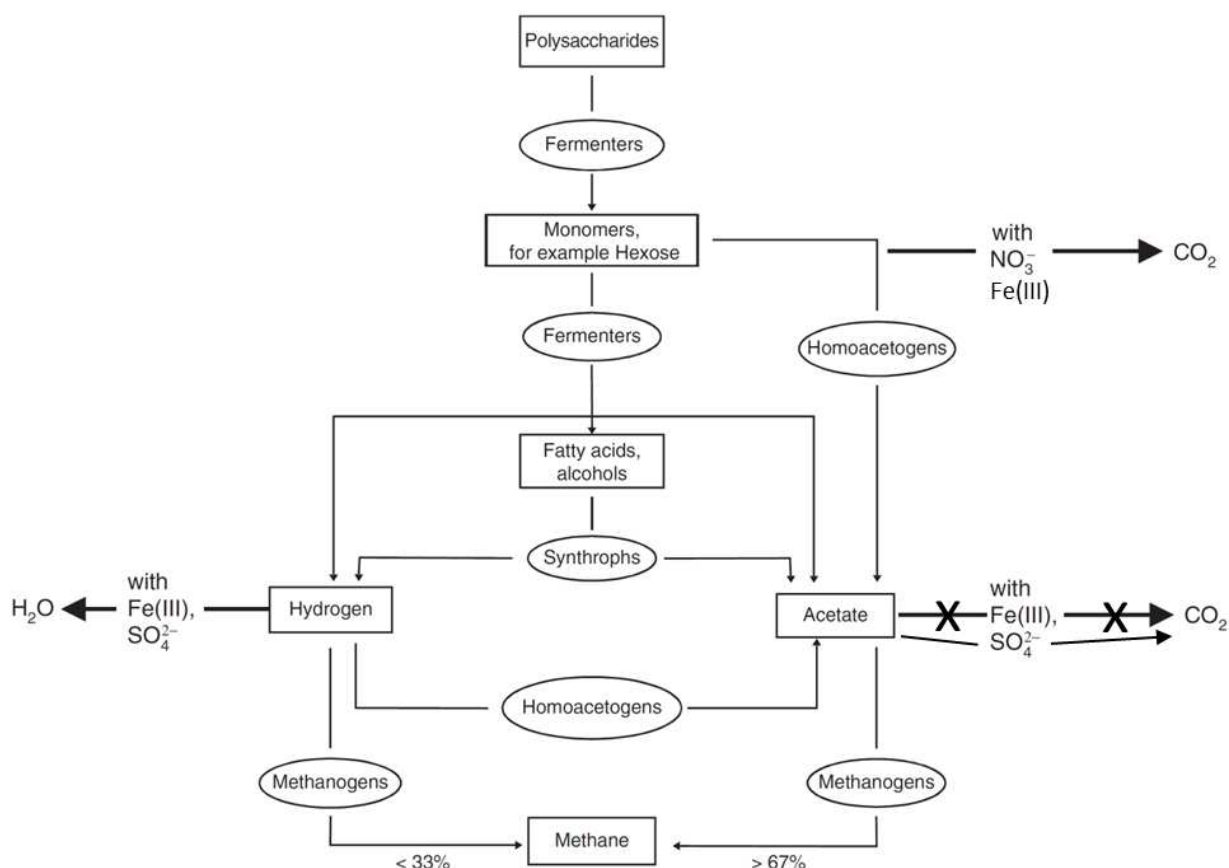


Figure 16 : Voie de dégradation de la matière organique, depuis les polysaccharides jusqu'au méthane. Les intermédiaires sont montrés dans les rectangles et les microorganismes dans les ovales. Les voies de diversion des substrats avec les nitrates, les sulfates et les oxydes de fer sont marquées par des flèches sortant de la chaîne. Les croix sur la diversion de l'acétate par le Fe(III) signalent que dans le Lac Pavin, les ferroréductrices ne semblent pas utiliser l'acétate comme donneur d'électrons, modifié d'après Conrad (2007).

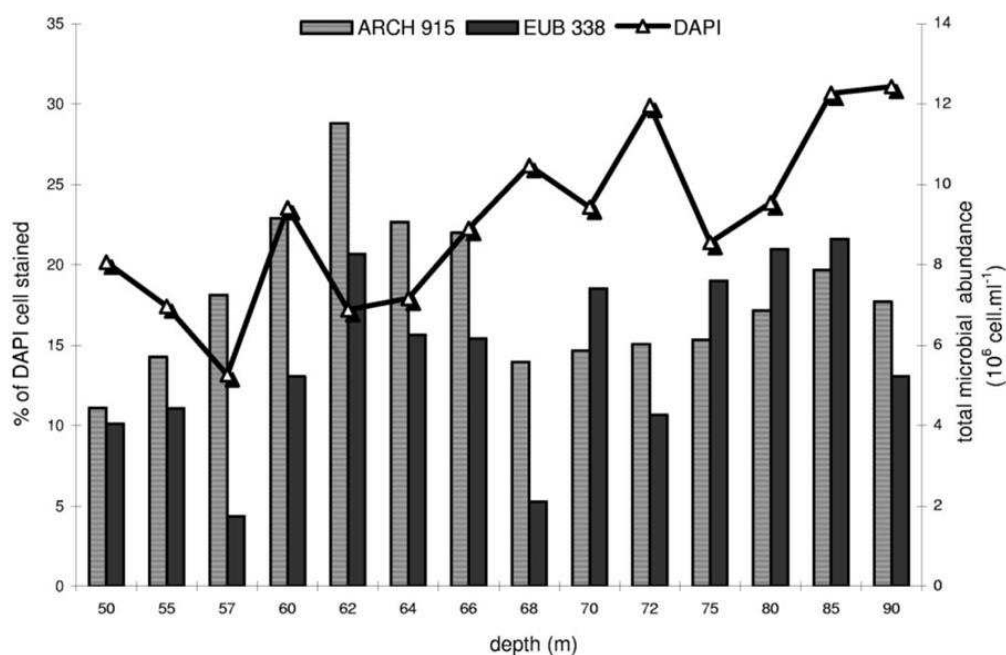


Figure 17 : Abondance procaryotique totale (DAPI) et proportions relatives de bactéries (sonde EUB 338) et d'archées (sonde ARCH915) exprimées en pourcentage du nombre de cellules totales dans l'oxycline et le monimolimnion, d'après Lehours *et al.*, (2005).

réductrices détectées, il est possible que ces dernières participent également à la réduction dissimilatrice du fer dans cette strate profonde. Cette hypothèse est en accord avec leur détection dans des cultures d'enrichissement ciblant les bactéries ferro-réductrices (Lehours et al. 2009).

En dépit d'une dominance de la biocénose anaérobie de cette strate profonde par des séquences affiliées aux *δ-Proteobacteria*, aucune parenté phylogénétique étroite n'a été observée avec des familles de bactéries ferro-réductrices (BFR) obligatoires de cette subdivision (Lehours *et al.*, 2007). Le Fe(III) représente pourtant l'oxydant majoritaire disponible pour les activités microbiennes anaérobies dans cette zone suggérant que les BFR jouent un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie. D'autre part, les données géochimiques acquises par l'Institut de Physique du Globe et l'Université Paris VII indiquent clairement l'implication de la fraction biologique dans la réduction du Fe(III) (Busigny *et al.*, données non publiées). Sans exclure l'existence de BFR obligatoires (connues ou encore inconnues), la réduction dissimilatrice du Fe(III) pourrait être accomplie dans cette strate profonde par des microorganismes non inféodés à ce métabolisme mais utilisant le Fe(III) dans des processus métaboliques alternatifs (bactéries fermentatives, sulfato-réductrices, *etc...*). Des approches culturelles d'enrichissement ont confirmé cette hypothèse (Lehours *et al.*, 2009) et ont révélé qu'en dépit du caractère facultatif que revêt ce processus chez les BFR non obligatoires, cette activité ne semble pas refléter un artefact métabolique mais confère un avantage physiologique et donc potentiellement écologique aux BFR facultatives de cette zone anoxique (Lehours *et al.*, 2010). Ces approches culturelles ont également mis en évidence que l'acétate, intermédiaire métabolique clé dans la chaîne trophique anaérobie (Fig. 16), n'est pas utilisé comme donneur d'électron pour la réduction dissimilatrice du fer (Lehours *et al.*, 2009).

IV.1.b. La communauté archéenne

Les archées sont en moyenne 1,5 fois plus abondantes que les bactéries dans la zone anoxique pélagique (Fig. 17) (Lehours *et al.*, 2005)). Bien qu'augmentant avec la profondeur, la richesse et la diversité de la communauté d'archées sont beaucoup plus faibles que celles de la communauté bactérienne sur l'ensemble de cette zone. Les archées sont très majoritairement affiliées aux méthanogènes appartenant aux *Methanosarcinales* et *Methanomicrobiales* (Fig. 18). Dans la partie supérieure de la chemocline (60 m) une densité élevée de *Methanobacteriales* a également été détectée par des approches d'hybridation *in*

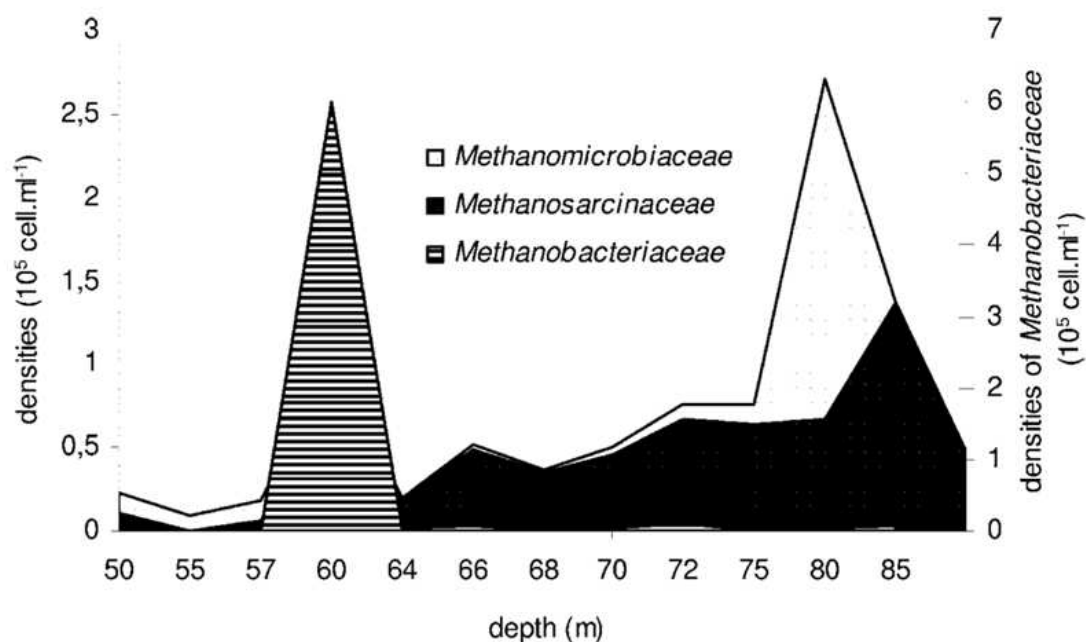


Figure 18 : Abondances des archées affiliées aux *Methanomicrobiaceae* (Sonde MG1200), aux *Methanosarcinaceae* (sonde MSMX860) et aux *Methanobacteriaceae* (sonde MB1174) dans l'oxycline et le monimolimnion, d'après Lehours *et al.*, (2005).

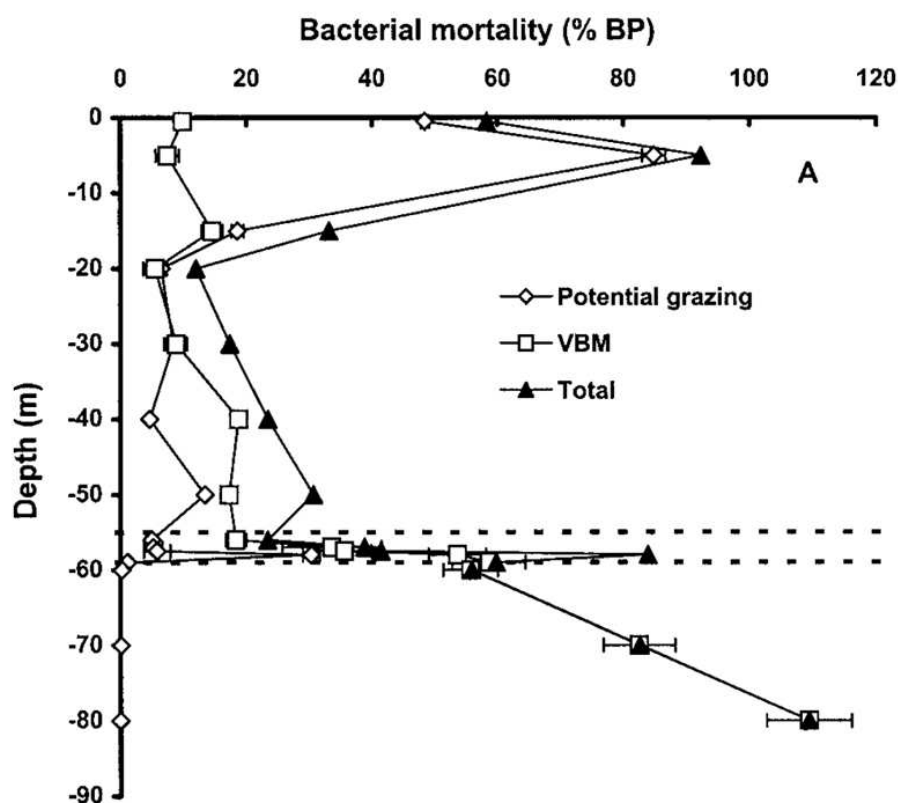


Figure 19 : Variations verticales de la mortalité procaryote liée au cycle lytique des virus (VBM) et de la mortalité procaryote potentiellement liée au broutage par des hétérotrophes nanoflagellés, d'après Colombet *et al.*, (2006).

situ (Fig. 18), (Lehours *et al.*, 2005)). Les *Methanosarcinales* détectées sont exclusivement affiliées au genre *Methanosaeta* strictement acétoclastes (Lehours *et al.*, 2007). La forte corrélation entre l'abondance des *Methanosarcinales* et les concentrations en méthane suggère que ce groupe pourrait être à l'origine de la majeure partie du méthane formé dans la colonne d'eau. La signature isotopique du méthane (Fig. 8), Agrinier *et al.*, données non publiées) et l'absence de compétition pour l'acétate avec les bactéries ferro-réductrices supportent cette hypothèse.

IV.2. Impact des virus sur les communautés microbiennes anaérobies

L'importance qualitative, quantitative et fonctionnelle des virus a été évaluée sur l'ensemble de la colonne d'eau du Lac Pavin (Colombet *et al.*, 2006 ; 2008 ; 2009) . Ces études ont révélé que la dynamique saisonnière du virioplancton en termes de diversité, d'abondance et d'activité est fortement associée à celle de la communauté microbienne. Dans la zone anoxique permanente, l'abondance des bactérivores (hétérotrophes nanoflagellés) est beaucoup plus faible que dans le mixolimnion, et l'impact des virus sur la mortalité microbienne augmente avec la profondeur (Colombet *et al.*, 2006). L'infection virale constituerait ainsi le principal contrôle descendant (« Top-Down ») agissant sur la communauté microbienne du monimolimnion (Fig. 19).

**CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DES
COMMUNAUTES PROCARYOTES
IMPLIQUEES DANS LE CYCLE DU METHANE
AU NIVEAU DE LA COLONNE D'EAU ET DES
SEDIMENTS SUPERFICIELS**

- ETUDE 1 et DONNEES COMPLEMENTAIRES -

Introduction

Les premières études des communautés de bactéries et d'archées de l'oxycline et de la zone anoxique pélagique permanente du Lac Pavin (Lehours *et al.*, 2005, 2007) ont permis d'accéder à des informations sur leur structure et leur diversité et de proposer des hypothèses sur les métabolismes microbiens impliqués dans la dégradation anaérobie de la matière organique. Ces études ont en particulier conduit à l'identification de séquences affiliées à des microorganismes impliqués dans le cycle biogéochimique du méthane. Ainsi, la présence de méthanotrophes aérobies à l'interface zone oxydée/zone anoxique et de méthanogènes sur l'ensemble de la colonne d'eau anoxique a été mise en évidence.

L'*étude 1* a pour objectif, d'une part, de préciser la composition et la structure des populations d'archées méthanogènes et de bactéries méthanotrophes dans la colonne d'eau et les sédiments superficiels du mixolimnion et du monimolimnion, et d'autre part de définir les zones où ces populations sont présentes et/ou actives.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans "*FEMS Microbiology Ecology*"

Etude 1: Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake.

Biderre-Petit C.^{1,2}, Jézéquel D.^{4,5}, Dugat-Bony E.^{1,2}, Lopes F.^{4,6}, Kuever J.⁷, Borrel G.^{1,2}, Viollier E.^{4,5}, Fonty G.^{1,2} and Peyret P.^{2,3*}

¹Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F63000, Clermont-Ferrand.

²UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France.

³Clermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F63000, Clermont-Ferrand.

⁴Université Paris 7, Laboratoire de Géochimie des Eaux, Institut de Physique du Globe de Paris, 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France.

⁵UMR CNRS 7154, Université Paris 7, 75205 Paris Cedex 13, France.

⁶Ecole Centrale Paris, Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux, EA 4038, Grande Voie des Vignes, 92295 Châtenay-Malabry, France.

⁷Bremen Institute for Materials Testing, Paul-Feller-Strasse 1, 28199 Bremen, Germany

*Corresponding author: Pierre Peyret, pipeyret@univ-bpclermont.fr.

Abstract

Lake Pavin is a meromictic crater lake located in the French Massif Central area. In this ecosystem, most of methane produced in high quantity in the anoxic bottom layers, and especially in sediments, is consumed in the water column with only a small fraction of annual production reaching the atmosphere. This study assessed the diversity of methanogenic and methanotrophic populations along the water column and in sediments using PCR and RT-PCR-based approaches targeting functional genes, *i.e.* *pmoA* (α -subunit of the particulate methane monooxygenase) for methanotrophy and *mcrA* (α -subunit of the methyl-coenzyme M reductase) for methanogenesis as well as the phylogenetic 16S rRNA genes. Although methanogenesis rates were much higher in sediments, our results confirm that methane production also occurs in the water column where methanogens were almost exclusively composed of hydrogenotrophic methanogens whereas both hydrogenotrophs and acetotrophs were almost equivalent in the sediments. Sequence analysis of markers, *pmoA* and 16S rRNA gene, suggested that *Methylobacter* may be an important group actively involved in the methane oxidation in the water column. Two main phylotypes were characterized, one of which could consume methane in conditions where oxygen amount is undetectable.

Introduction

Methane is an important radiative trace gas responsible for about 20% of the anthropogenic additional greenhouse effect. Global CH₄ emissions from natural wetlands range from 100 to 237 Tg.year⁻¹, corresponding to approximately 75% of all natural emissions. Lakes alone are believed to contribute 6-16% of these natural emissions (Bastviken, 2009). Methane production is a strictly anaerobic process restricted to environments with very low concentrations of alternative electron acceptors (manganese and iron oxides, oxygen, nitrate and sulfate) and high concentrations for the common electron donors, particularly H₂ and acetate (Capone and Kiene, 1988). The two main pathways of production are acetotrophic (acetate dependent) and hydrogenotrophic (H₂ dependent) methanogenesis. In the former case, acetate is cleaved into CH₄ and carbon dioxide (CO₂). During hydrogenotrophic methanogenesis, H₂ reacts with CO₂ to produce CH₄ and H₂O (Bastviken, 2009). However, still today, there is little evidence of any significant rates of methanogenesis in anoxic water columns, supposedly due to the lower substrate concentrations than in sediment (Bastviken, 2009). Stable syntrophic consortia could be more difficult to establish in water columns than sediments due to the greater transport processes involved. Water chemistry in meromictic lakes is another important factor in determining whether methanogenesis occurs in the water column and in the sediment (Winfrey and Zeikus, 1979).

Once produced in aquatic environments, CH₄ is consumed in both aerobic and anaerobic compartments. Thus, although from 45% to 100% of CH₄ produced in the water column of lakes or derived from benthic flux is oxidized (Bastviken, 2009), even today little is known about the structure of methanotrophs in pelagic freshwater ecosystems. Aerobic oxidation by CH₄-oxidizing bacteria in surface sediments (Sweerts *et al.*, 1991) and in the water column (Utsumi *et al.*, 1998b) is the main pathway controlling CH₄ escape into the atmosphere, making it a key process for the mitigation of CH₄ emissions from aquatic environments (Bastviken, 2009). In freshwaters, CH₄ oxidation is most active in the vicinity of the oxic-anoxic interface where both CH₄ and O₂ are available. The second process controlling CH₄ release is anaerobic oxidation of methane (AOM), which is thought to involve CH₄-oxidizing archaea in consortium with sulfate-reducing bacteria (Boetius *et al.*, 2000). Although mainly observed in saline/alkaline anoxic continental habitats (Joye *et al.*, 1999), recent studies suggest this

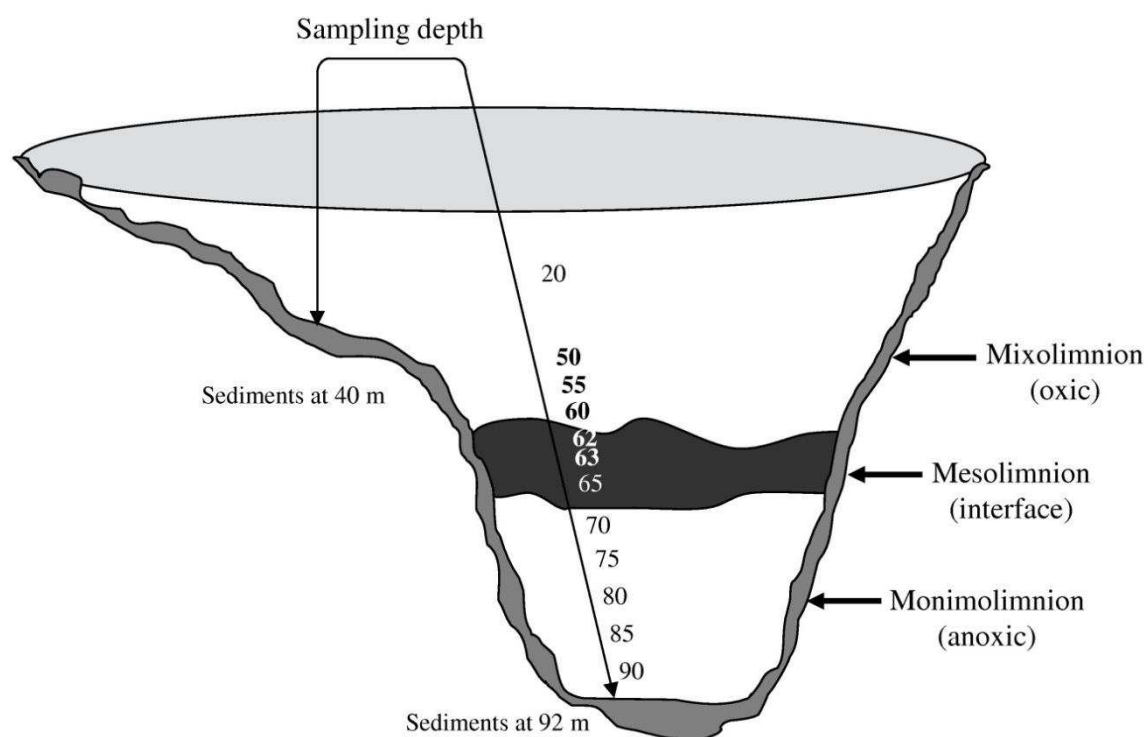


Figure 1: Cross section on Lake Pavin showing the location of sampling.

pathway also occurs in freshwater environments through non-sulfate terminal electron acceptors (Raghoebarsing *et al.*, 2006).

Lake Pavin in the French Massif Central is a permanently stratified crater lake with layers of water that do not intermix. Hence, this meromictic lake has three water layers, an anoxic deep water layer (monimolimnion) separated from the oxygenated upper layer (mixolimnion) by an intermediate layer (mesolimnion) with strong chemical gradients. The sharp increase in concentration of dissolved compounds within the mesolimnion leads to an increase in density of the bottom water layers and consequently strengthens the stability of the physical stratification, despite a temperature increase of about 1°C (Michard *et al.*, 2003). The isolation of the monimolimnion (by the mesolimnion) results in a significant CH₄ accumulation (over 4 mM at 90 m depth). This situation causes a strong CH₄ concentration gradient within the mesolimnion, but only a small amount (a 10⁵ decrease in concentration from the bottom to the top of the lake) of this CH₄ actually reaches the atmosphere, as it is near fully consumed in the water column.

The identification of organisms involved in methanotrophy and methanogenesis within Lake Pavin is a key step for a complete understanding of the CH₄ and carbon cycles in this ecosystem. In this study, the diversity and the vertical distribution of methanogens and methanotrophs were assessed along the entire water column and sediments of this lake using two functional gene markers (*i.e.* the α -subunit of the particulate methane monooxygenase (*pmoA*) for methanotrophy, the α -subunit of the methyl-coenzyme M reductase (*mcrA*) which catalyzes the last step in methanogenesis. Additional studies with 16S rRNA gene analyses were also realized at two critical points in the water column. Our results provide insights into the substrate or niche adaptations of these communities.

Materials and methods

Sampling site. Lake Pavin (N 45°29.74, E 2°53.28) is a maar located at 1197 a.s.l. in the more recent volcanic area of the French Massif Central. It is divided into two permanent stratified layers (Fig. 1) (Michard *et al.*, 2003). The surface stratum, or mixolimnion, includes three different layers according to variations in depth, temperature, pH and dissolved O₂ (the epilimnion, up to 5-15 m depth, the metalimnion, from the bottom of epilimnion up to 20 m depth and the hypolimnion from approximately 20 to 61 m depth). Seasonal dissolved O₂ depletion occurs at the base of the hypolimnion with a value close to zero between around

58 and 61 m depth. The mixolimnion is separated from the monimolimnion by the mesolimnion (~ 60 to 70 m depth), which is characterized by a strong increase in specific conductivity. Finally, the monimolimnion, from ~70 m depth to sediments, is not affected by spring or fall turnover. This one is characterized by a steady state of the major physical and chemical parameters.

Analytical method. Conductivity, temperature and dissolved oxygen (DO) concentration were determined with a Seabird SBE 19 Seacat profiler (Sea-Bird Electronics, Inc., Washington) in July 2007 and May 2009. This CTD-O₂ probe was calibrated for DO with Winkler titrations in triplicate samples from 2 and 40 m depths (where O₂ gradients are very weak). Profiles were acquired at a speed of descent as low as 5 cm.s⁻¹ in the O₂ gradient zone to allow the O₂ sensor to equilibrate.

Water samples for CH₄ concentration determination were collected in July 2007 using a custom-built automatic 1 L syringe sampler, which was built on a 1 L syringe Model S-1000 Hamilton basis, along a vertical profile near the center of the lake. The sampler was deployed from a stable platform, and use of electronic depth gauge allowed a 0.2 m depth precision, and direct filtration from 1 L syringe just after retrieving on board without air contact (Luer connections and use of syringe filtration units). Water from the oxic mixolimnion (from the surface down to 55 m) was collected into 115 mL serum bottles filled to overflow then sealed and poisoned with 1 mL of 0.5 g.L⁻¹ HgCl₂ until analysis. A 30 mL nitrogen headspace was then created before analysis, as described by Abril and Iversen (2002). In the CH₄-rich zone (from 55 to 90 m depth), a different sampling method was used in order to minimize CH₄ loss due to depressurization: 30 mL of water from the sampling syringe was rapidly transferred with a needle through the butyl cap into pre-weighed and N₂-pre-flushed sealed glass bottles. Thus, most of the depressurization occurred in the bottle, minimizing CH₄ loss. CH₄ concentrations were quantified using a gas chromatograph (Chrompack 438 gas chromatograph, Packard Instruments, Downersgrove, IL, USA) equipped with a 2 m × 2 mm Haysep column and a flame ionization detector.

Sample collection. Water column samples were collected using an 8-liter horizontal Van Dorn bottle along a vertical profile at 9 depths (20, 50, 60, 63, 65, 70, 75, 80, 85 and 90 m) in July 2007 and 3 depths (65, 70 and 90 m) in June 2009 (Fig. 1). Immediately on collection,

the water samples were transferred into sterile bottles and stored on ice until processing. The water samples (0.3 to 1 L) were filtered directly in the laboratory under vacuum, and collected onto a 47 mm TSTP Millipore filter (0.2 μm pore size). Filters were stored dry at -80°C until nucleic acid extractions.

Supplementary water column samples (also 0.3 to 1 L) were collected using a 4 mm-bore PVC tube connected to a peristaltic pump, and filtrated on-site through a 47 mm TSTP Millipore filter (0.2 μm) held in a Swinnex-47 (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) filter holder connected to the tube, at 62 m depth in December 2007 and at 4 depths (50, 55, 60 and 63 m) in June 2009 (Fig. 1). This second sampling method was used, when possible, to reduce mRNA transcription modifications or their destruction, which could be induced by transport. Thus, filters were immediately placed into 2 mL sterile tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and stored on dry ice until they were transferred at -80°C to the laboratory for further nucleic acid extraction. Unfortunately, this sampling was not applied for depths below 63 m due to excessively high degassing in anoxic zone. Sediment samples were collected at 40 m depth (within the oxic zone) and at 92 m (within the anoxic zone) in June 2007 and only at 92 m in June 2009 using a gravitational Uwitec corer with a diameter of 90 mm and length of 60 cm (Fig. 1). About 100 grams of each sediment sample from the upper sediment horizon (first 20 cm) were separately placed in sterile containers and stored on dry ice until being transferred to the lab at -80°C for further processing.

Nucleic acid extractions. Genomic DNA (gDNA) was extracted from samples collected in 2007 and total RNA was extracted from samples collected in 2009. Water column filters were placed in 900 μL of lysis buffer as described by Vetriani *et al.*, (2003). Freeze-thaw cycles were replaced by the beat-beating method, and nucleic acids were extracted using a standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol (50:49:1) method followed by a second extraction with an equal volume of chloroform. Nucleic acids were then precipitated, washed in 70% ethanol, and resuspended in nuclease-free water. For RNA samples, co-extracted DNA was removed by digestion with 4U of (RNase-free) DNase I (DNA-free, Ambion, Austin, TX, USA) at 37°C for 35 min following the manufacturer's instructions.

Frozen sediment aliquot (30 g) collected in June 2009 was mixed vigorously with 200 mL of buffer containing glucose, EDTA and Tris-HCl (Vetriani *et al.*, 2003) and centrifuged briefly at 200 g before filtering the supernatant onto a 47 mm TSTP Millipore filter (0.2 μm).

Amplification	Primer	Sequence 5' - 3'	Annealing temp (°C)	N° of cycles	Expected size	Reference
<i>pmoA</i>	pmoA189f mb661r	GGNGACTGGGACTTCTGG CCGGMGCAACGTCYTTACC	55	40 (DNA)	~ 500	Costello and Lindstrom, 1999
<i>mcrA</i>	MM_01 MM_02	TAYATGTCIGGYGGTGTHGG ACRTTCATIGCRTAGTTIGG	48	30 (cDNA)	~ 500	Mihajlovski et al, 2008
16S rRNA	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG AGGRTACCTTGTTACGACTT	59	30 (DNA)	~ 1500	Lane, 1991

Table 1: Primer sets and PCR conditions used to amplify *pmoA*, *mcrA* and 16S rRNA gene markers.

The filter was then placed into 900 μL of lysis buffer. RNA was extracted as described above. DNA from frozen sediment aliquots (3 g) sampled in June 2007 was extracted using the protocol described by Zhou *et al.*, (1996).

Nucleic acid concentrations were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop, USA). The integrity of the extracted RNA was checked by analyzing an aliquot on a Model 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) using the RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). DNA integrity was analyzed on agarose gel.

cDNA synthesis. cDNA synthesis was performed starting with 100 ng RNA and using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). To remove secondary structure, the mixture containing RNA diluted with DEPC-treated water in a final volume of 12 μL and 0.5 μL of gene specific primer (25 mM) was heated for 10 min at 70°C and immediately placed on ice. Four microliters of 5X buffer (supplied), 2 μL 0.1M DTT, 0.5 μL dNTP mix (2.5 mM each), 0.5 μL (20U) RNasin⁺ (Promega, Madison, USA) and 0.5 μL SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) were then added. The mixture was incubated for 2 h at 42°C for cDNA synthesis. In order to check the RNA extracts were uncontaminated by DNA, control reactions were prepared as described above, but without reverse transcriptase.

PCR and library construction. Table 1 summarizes the primers and cycling parameters used in this study. PCR amplifications were performed in tubes containing 25 μL (total volume) of mixture using an iCycler thermal cycler (Biorad, California, USA). Each PCR mix consisted of 1X PCR buffer (Promega, Madison, USA), 0.2 μM of forward and reverse primers, 250 μM of each deoxynucleoside triphosphate (Invitrogen Carlsbad, California, USA), 2U of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, USA) and template DNA (5-20 ng of gDNA or 4.5 μL of cDNA). For all amplifications, a 5-min denaturation step (95°C) was included at the beginning of the PCR run. This step was followed by cycles at the annealing temperatures given in Table 1, and a 10 min extension step (72°C) was included at the end of the reaction. Negative controls were included in all PCR reactions to check for background contamination.

The PCR products were assessed on 1% (w/v) agarose gels. Amplicons of the correct size were purified using QIAquick spin columns (Qiagen, Chatsworth, California, USA) and

cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen, Inc., Carlsbad, California, USA). Plasmids were screened for the correct size insert by digestion with *EcoRI*. DNA sequencing was performed using the Sanger method (Sanger *et al.*, 1977) on MWG DNA sequencing services (Ebersberg, Germany).

Sequence data and phylogenetic analysis. Sequences were processed and joined using the Staden Package Program (Staden, 1996) and characterized using the BLASTN (16S rRNA genes) and BLASTX (functional genes) search tools (www.ncbi.nlm.nih.gov). The nucleic acid sequences encoding enzymes were translated using the EMBOSS transeq tool available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/> and aligned using ClustalW to identify identical amino acid sequences (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). After alignment, we conserved only the different deduced amino acid sequences and then grouped them into operational taxonomic units (OTUs) at a cutoff level of 91% (Heyer *et al.*, 2002; Luton *et al.*, 2002; Kjeldsen *et al.*, 2007) using DOTUR software (Schloss and Handelsman, 2005). The input files for DOTUR were distance matrices generated by ProtDist (http://mobyli.pasteur.fr/Mobyli_programs/protldist.xml). One representative of each OTU was subsequently chosen to build phylogenetic trees in MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007) using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987), and then bootstrapped with 1000 trials. Closely-related sequences identified by BLAST and available from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) plus sequences of characterized species were included in the phylogenetic trees to decipher microbial community diversity.

Nucleotide sequence accession numbers. Nucleotide sequences without PCR primer sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers GQ389796 to GQ390089 for *mcrA* gene, GQ390100 to GQ390158 and JF811254 to JF811322 for *pmoA* gene, and GQ390159 to GQ390243 and GU472558 to GU472841 for 16S rRNA genes.

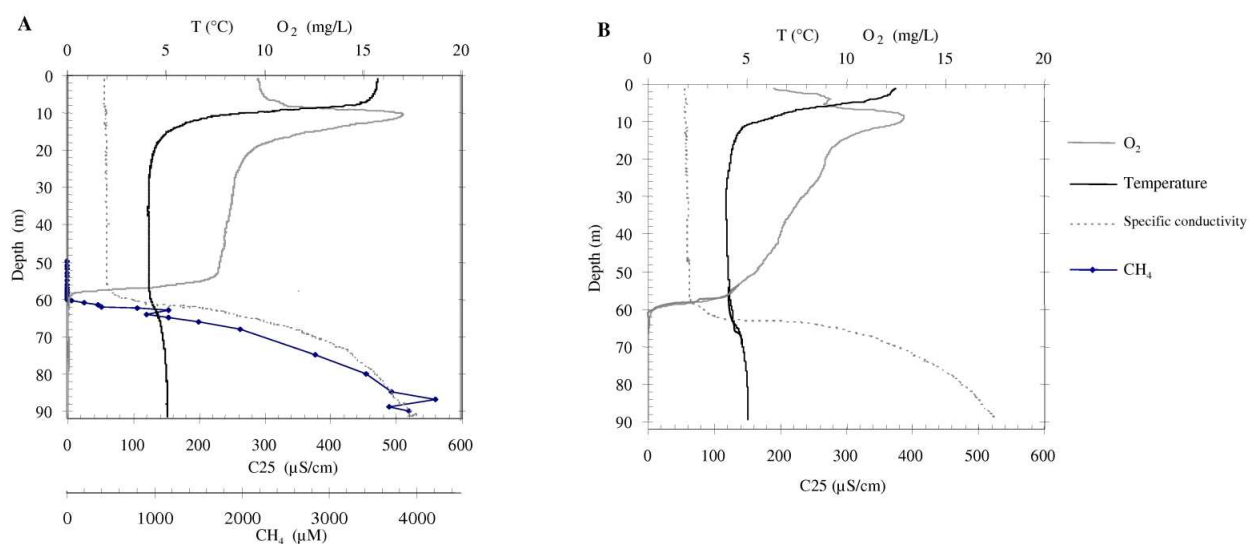


Figure 2: Vertical profiles of dissolved oxygen (DO), conductivity at 25°C (C25), temperature and CH₄ concentration along the water column of the Lake Pavin in July 2007 (A) and May 2009 (B).

Results

Geochemistry

The investigations were carried out using water samples collected in Lake Pavin. Figure 2 shows vertical profiles of dissolved oxygen (DO), conductivity at 25°C (C25), temperature and CH₄ concentration for July 2007 and May 2009 (except CH₄ which was not measured in May 2009). All parameters taken together, the profiles showed typical trends usually observed in Lake Pavin, *i.e.* O₂ depletion (detection limit <1µM) and a sharp increase in C25 and CH₄ at around 60 m depth (Viollier *et al.*, 1997; Michard *et al.*, 2003). In July 2007, maximum gradients for DO and C25 were located at 57 m depth (oxycline) and 62.1 m depth (mesolimnion), respectively. At this period, the maximum gradient for CH₄ was located at 62.5 m depth, *i.e.* almost superimposed with the mesolimnion. At 60 m depth, DO and CH₄ were 0.06 mg.L⁻¹ and 0.3 µM, respectively, corresponding to a small overlap between the two parameters.

Methanogen abundance and distribution

PCR amplicons of *mcrA* were obtained both from gDNA and cDNA using a specific primer set (MM_01-MM_02) that enables coverage of a large portion of methanogens (Mihajlovski *et al.*, 2008) and subsequently used for the construction of separate clone libraries. Ten clone libraries consisting of 306 clones were constructed from gDNA samples collected in 2007, 8 from water column samples (63, 65, 68 m and then, every 5 m from 70 to 90 m) and 2 from sediments (40 and 92 m). Three additional clone libraries consisting of 67 clones were also constructed from cDNA samples collected in 2009 (70 m, 90 m and sediments at 92 m). No amplification of the *mcrA* gene could be achieved with gDNA collected from the water layer located above 63 m depth and with cDNA obtained from that located above 70 m depth. This suggested that the active methanogenic community was present only from nearly 70 m depth down to the sediments. Furthermore, considerable microdiversity was evident among the sequenced clones as 303 unique *mcrA* nucleic acid sequences were identified which coded for 210 different polypeptides, taking into account all genetic code redundancy. In total, 20 distinct OTUs were detected among the inferred amino acid sequences of *mcrA* using an arbitrary 91% sequence identity threshold for grouping the retrieved environmental sequences. Nineteen OTUs were present in gDNA libraries and 10 in cDNA libraries. Comparisons at the amino acid sequence level of *mcrA* gene fragments revealed a number of associations. These OTUs covered 3 lineages encompassing *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, and a putative third lineage.

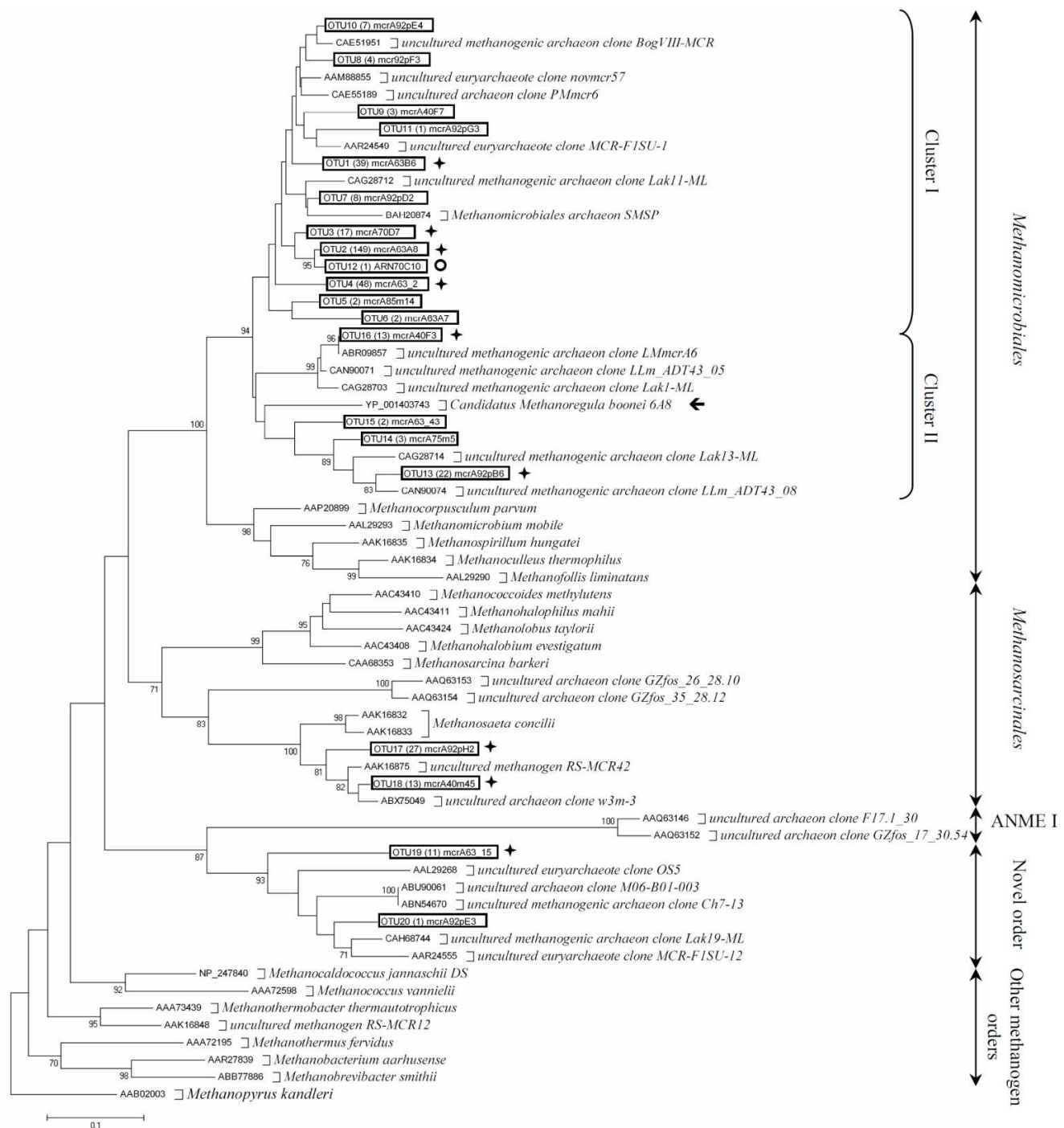


Figure 3: Evolutionary distance tree showing the phylogenetic relationship of the deduced McrA amino acid sequences including representative sequences derived from this study and sequences of isolates and uncultivated organisms. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007). Evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 127 positions in the final dataset. Bootstrap values greater than 70% derived from 1000 replicates are indicated at nodes. The number of clones assigned to each OTU is given in brackets together with the name of the representative clone used in this study. *Methanopyrus kandleri* sequence (AAB02003) was used as outgroup. Arrow indicated the unique closest cultured methanogen species to environmental *Methanomicrobiales* sequences. Arrow indicated the only cultured species *Candidatus Methanoregula boonei* to which are more closely related environmental sequences derived from this study. + Symbol indicated phylotypes clustering gDNA and cDNA sequences, ○ symbol indicated the phylotype with only a cDNA sequence.

Most of *mcrA* sequences were closely related to the *Methanomicrobiales* order (52 to 100% of total gDNA clones and 58.6 to 92.3% of total cDNA clones, depending on the library). Two groups of sequences clustered within this order where they formed a distinct branch (Fig. 3). One group (cluster I) included 12 OTUs (OTU1 to 12) which showed strongest similarity to many environmental sequences (Luton *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2004; Galand *et al.*, 2005; Conrad *et al.*, 2008). The second group (cluster II) included only 4 OTUs (OTU13 to 16) which showed 83-84% similarity to only one recognized species recently described in an acidic peat bog, *Candidatus Methanoregula boonei* (Bräuer *et al.*, 2006). Of the 16 OTUs, six included sequences both from gDNA and cDNA libraries, nine included only sequences from gDNA libraries, and one (OTU12) consisted of only one cDNA sequence (Fig. 3). Both gDNA and cDNA libraries were dominated by a small number of OTUs, the most abundant being OTU2 (Fig. 4). Moreover, the spatial distribution of these OTUs showed clear differences between water column and sediments but also, between sediments in contact with oxygenated water (40 m) and those in contact with anoxic water (92 m). Obviously, OTU7, 8, 10 and 11 dominated sediments collected at 92 m while they were poorly represented (in clone number) or absent in the water column (Fig. 4A).

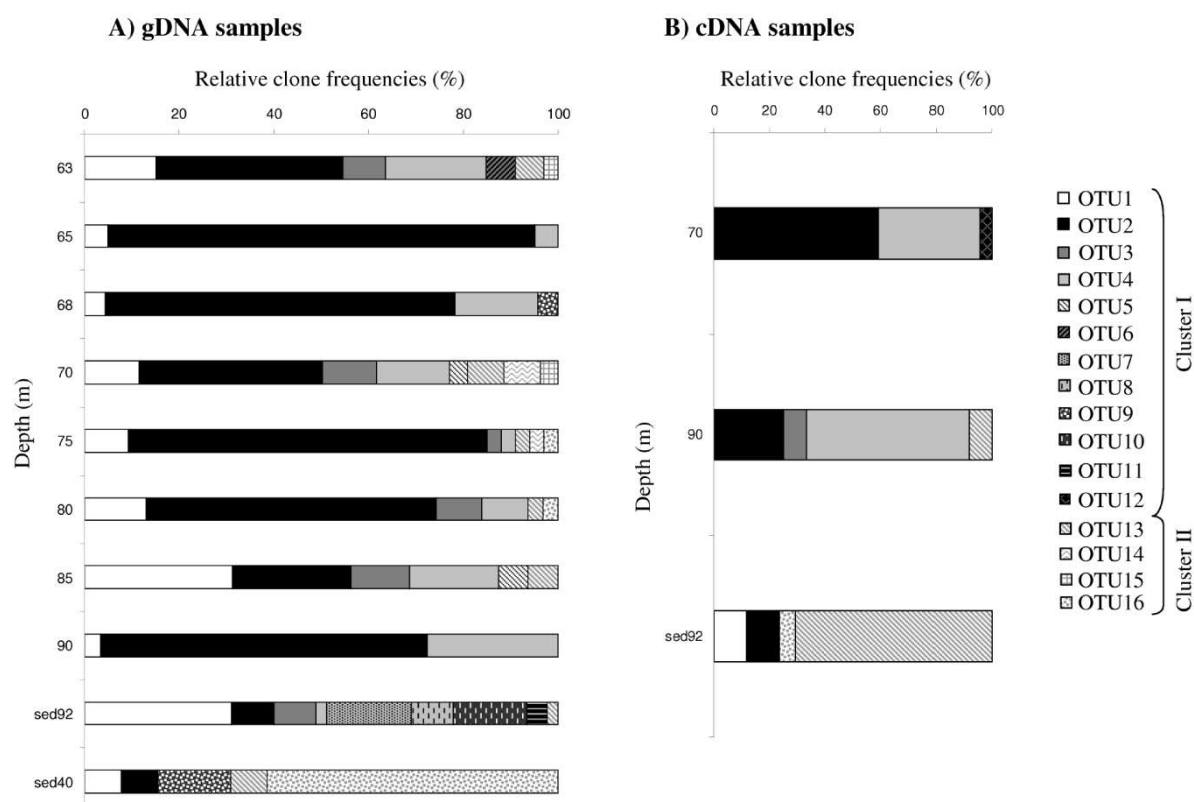


Figure 4: Distribution pattern of the different OTUs related to the *Methanomicrobiales* order along the water column and in sediments. A) Sequences retrieved from gDNA libraries. B) Sequences retrieved from cDNA libraries.

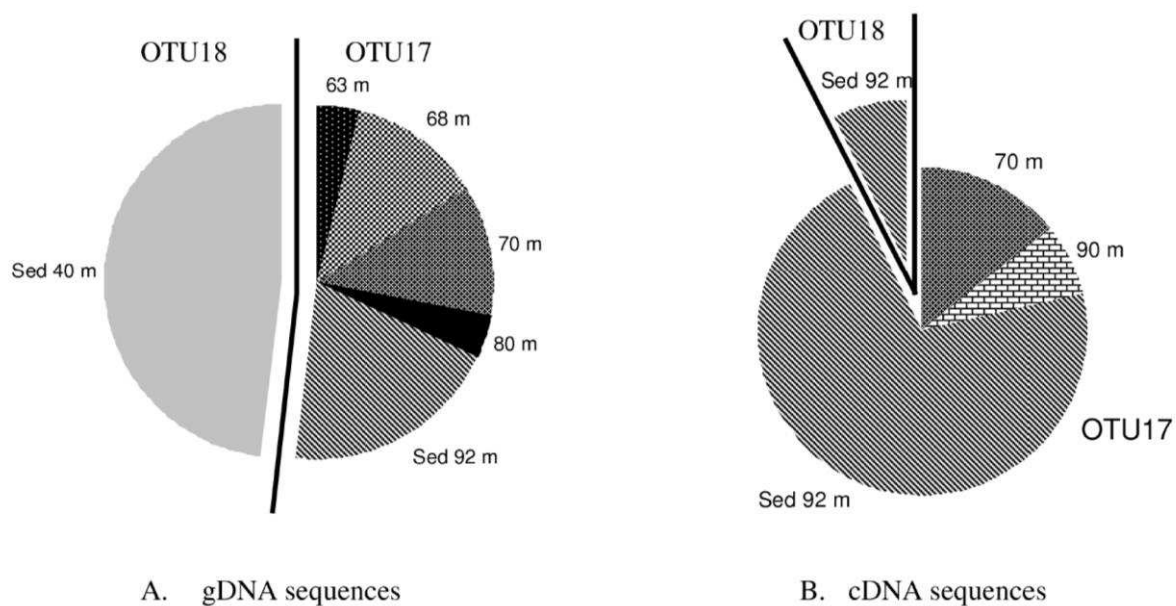


Figure 5: Distribution of sequences affiliated with the two OTUs related to the *Methanosarcinales* for each library. A) Sequences retrieved from gDNA libraries. B) Sequences retrieved from cDNA libraries.

Similarly, OTU16 dominated sediments collected at 40 m while it was not retrieved from those collected at 92 m. All these findings suggested that certain OTUs could be adapted to different environmental niches (organic matter content, microbial interactions, substrate availability). This hypothesis was reinforced by the analysis of *mcrA* transcripts with OTU2 and OTU4 from cluster I mainly expressed in the water column and OTU13 from cluster II preferentially expressed in the bottom of the water column and in sediments (Fig. 4B).

The second most abundant group of *mcrA* sequences was closely related to the *Methanosarcinales* order (2.7 to 12.5% of total gDNA clones and 7.7 to 37.9% of total cDNA clones, depending on the library). All sequences grouped into 2 distinct OTUs (OTU17 and 18), both converging on a monophyletic group which included the acetoclastic species *Methanosaeta concilii* (Fig. 3). This order, therefore, displayed a lower diversity than that of *Methanomicrobiales*. For these OTUs, the largest number of clones was retrieved from sediments (Fig. 5). Furthermore, they showed a clear different distribution profile, with OTU18 retrieved mainly from sediments in contact with oxygenated water (40 m) whereas OTU17 was retrieved exclusively from those in contact with anoxic water (92 m) and water column (Fig. 5). These results were consistent with those obtained from mRNA samples. Hence, the shift in *Methanosaetaceae* assemblage could be correlated with changes in environmental conditions (*i.e.* pressure, oxygen and microbial interactions).

The third lineage clustered only 12 clones (11 in OTU19, 1 in OTU20) which fell outside any described methanogenic order and formed a deep-branching cluster separate from the other five methanogen orders (Fig. 3). The evidence suggests this cluster may represent a novel methanogenic lineage. These OTUs had highest similarity (80–83%) to *mcrA* sequences from remotely different habitats including wetland ecosystems (Juottonen *et al.*, 2005), landfill (Luton *et al.*, 2002), drainage water (Castro *et al.*, 2004) and human gut (Mihajlovski *et al.*, 2008), whose phylogenetic affiliation remained doubtful. The fact this lineage is recovered from various independent ecosystems suggests it is widely distributed in the environment. In addition, transcripts for this lineage were detected in both water column and 92 m sediment. The closer relative of this lineage is the anaerobic methane oxidizer ANME-1 cluster (Fig. 3) which is characterized by a cysteine-rich (CCX4CX5C) stretch in its *mcrA* sequence (Hallam *et al.*, 2003; Shima and Thauer, 2005). Because of the absence of this signature in *mcrA* sequences affiliated to the novel lineage, its involvement in methanogenesis or anaerobic methanotrophy remains unclear.

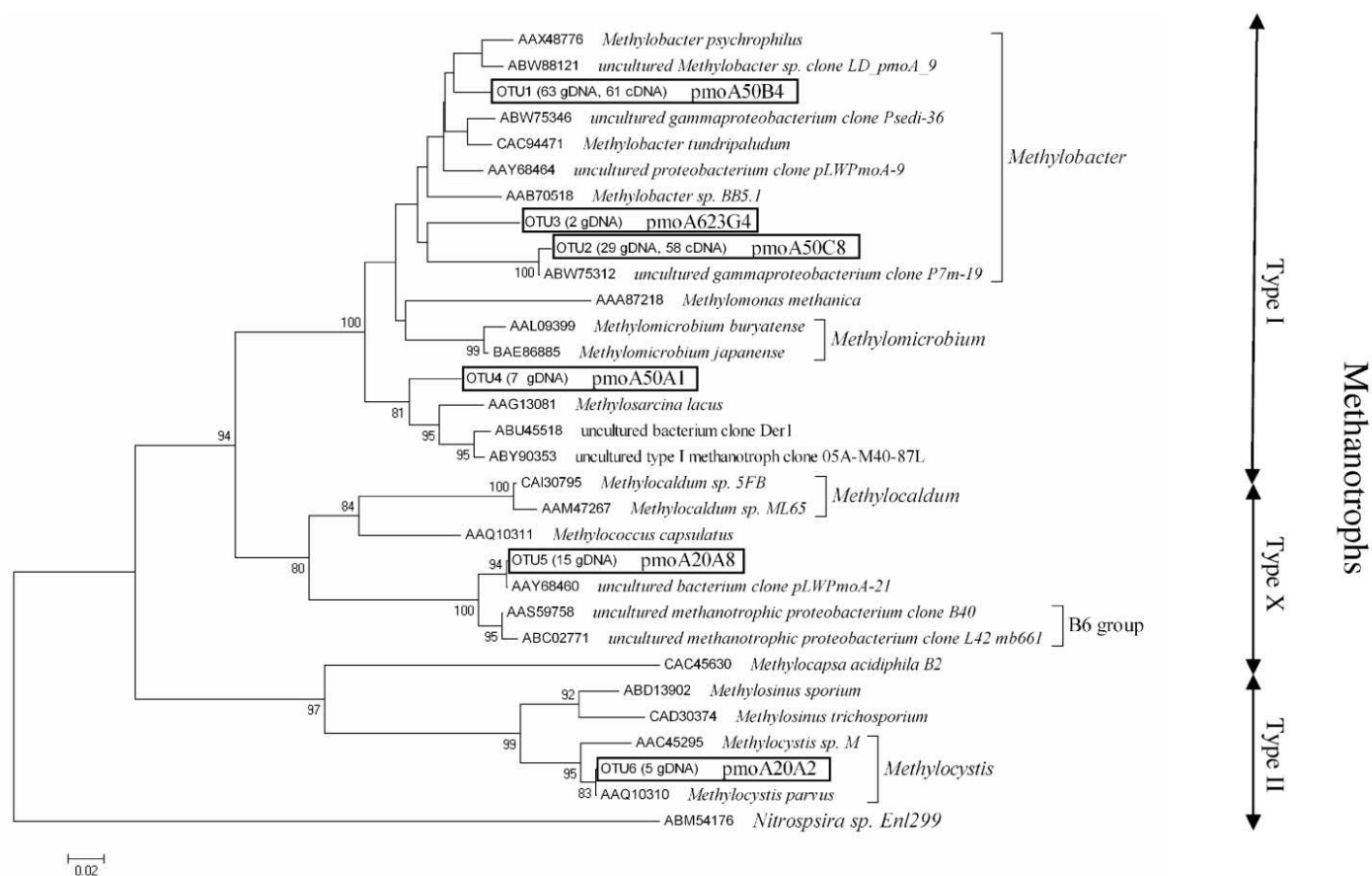


Figure 6: Evolutionary distance tree showing the phylogenetic relationship of the deduced PmoA amino acid sequences including representative sequences derived from this study and sequences of isolates and uncultivated organisms. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007). The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 139 positions in the final dataset. Bootstrap values greater than 70% derived from 1000 replicates are shown at nodes. The number of gDNA and cDNA clones assigned to each OTU is given in brackets, together with the name of the representative clone used in this study. *Nitrospira sp. Enl299* sequence (ABM54176) was used as outgroup. At right is indicated the name of the representative clone used for each phylotype.

Methanotroph abundance and distribution

The planktonic methanotroph assemblages were investigated by *pmoA* gene amplification using a specific primer set (Costello and Lidstrom, 1999) from fewer sample points along the water column. PCR amplicons of *pmoA* were subsequently used for the construction of separate clone libraries. Seven clone libraries consisting of 120 clones were constructed from gDNA samples, 5 from the oxic layer (20, 50, 60, 62 and 63 m) and 2 from the anoxic layer (70 and 75 m). Five additional clone libraries consisting of 119 clones were also constructed from cDNA samples (50, 55, 60, 63 and 65 m). Only one clone of the 6 sequenced for gDNA sample collected at 75 m was *pmoA*, therefore, amplicons obtained from greater anoxic depths were considered as false positives and not cloned. No RT-PCR products were achieved with cDNA from the water layer located below 65 m depth, suggesting that this gene was only expressed up to this zone, where oxygen was under detection threshold. Like for *mcrA* gene, a large microdiversity was also observed for *pmoA* because 128 unique *pmoA* nucleic acid sequences were identified which coded for 94 different polypeptides. In total, 6 distinct OTUs were detected among the inferred *pmoA* amino acid sequences (>91% sequence identity threshold); only two were present in cDNA libraries (Fig. 6).

The most abundant *pmoA* sequences, distributed into 3 OTUs (OTU1 to 3), were from type I methanotrophs closely related to *Methylobacter* genus. These sequences were dominant at all depths tested (Fig. 7).

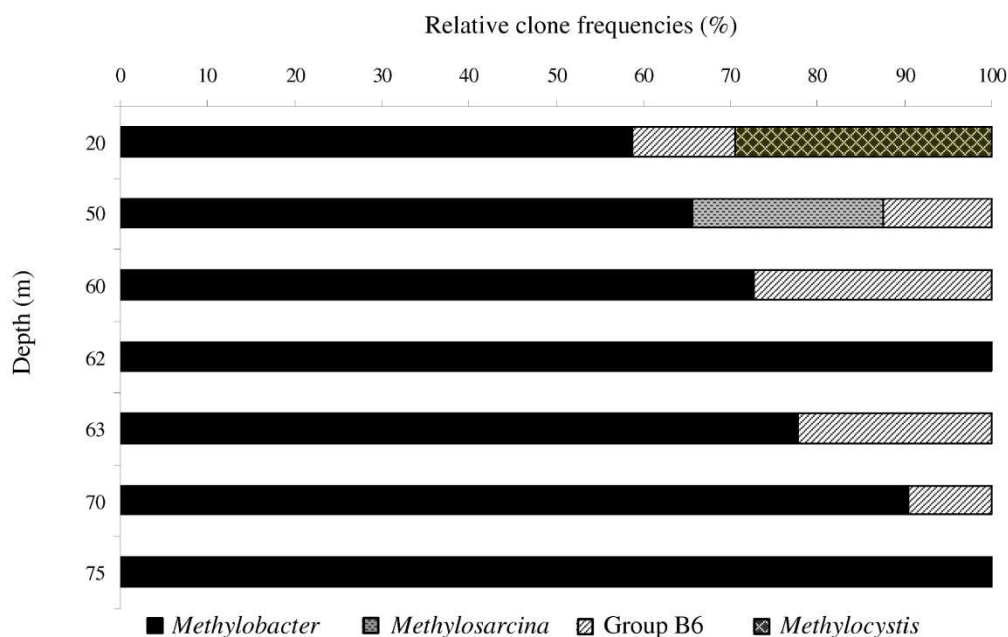


Figure 7: Relative composition of *pmoA* clone libraries generated from gDNA samples at different depths along the water column of Lake Pavin. The sequences related to *Methylobacter* species and the sequences related to group B6 were broadly distributed through the water column whereas *Methylocystis* and *Methylosarcina* species were specific to certain layers. The percentage of clones calculated for each depth is presented.

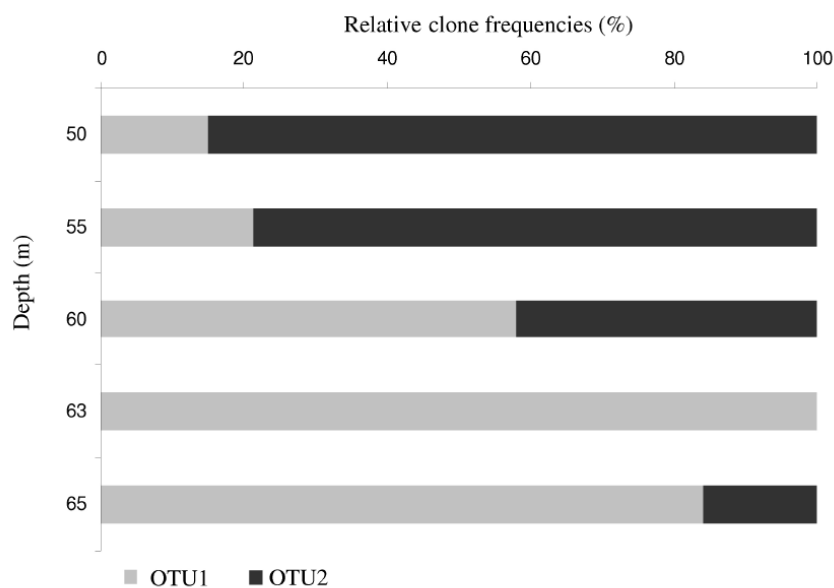


Figure 8: Distribution pattern of transcripts along the water column for OTU1 and OTU2, both related to the *Methylobacter* genus,. OTU2 was dominant up to 55 m and OTU1 from 55 to 65 m.

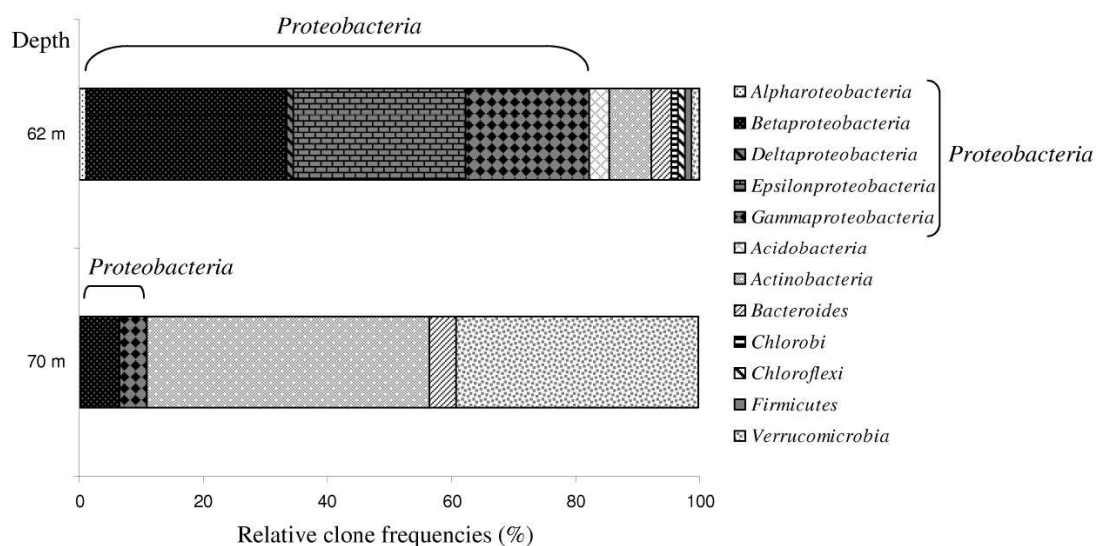


Figure 9: Percentage contribution of 16S rRNA gene sequences in the water column of Lake Pavin assigned to main bacterial phyla.

OTU1, which clustered the majority of clones both from gDNA and cDNA libraries, was more closely related to *Methylobacter psychrophilus*, whereas the last two OTUs were readily distinguishable from the known *Methylobacter* species and formed a separate branch within this group, clustering with environmental clones (Fig. 6). *pmoA* transcripts were detected only for OTU1 and 2, suggesting they were the predominant active groups in this ecosystem. Figure 8 showed, subsequently, that transcripts for each OTU had distinct distribution profile along the water column, OTU2 being mainly expressed in the upper part of the water column up to 60 m depth and OTU1 being most actively present below 60 m depth. These findings could suggest that OTU2 activity would be more sensitive to oxygen deprivation than OTU1, an almost full disappearance of this gas being observed around 60 m depth.

The last three OTUs (OTU4 to 6) were only retrieved from gDNA libraries. They were only marginal (*i.e.* in terms of relative clone abundance). Their distribution along the water column was different (Fig. 7), suggesting a vertical shift in their assemblage which could be linked with methane or oxygen concentration (Fig. 2). Both OTU4 (7 clones) and OTU5 (15 clones) were associated with members of the *Methylococcaceae*, the first being closely related to *Methylosarcina lacus* (AAG13081) in type I methanotrophs and the second to the clone group B6 (Pester *et al.*, 2004) in type X methanotrophs. Obviously, only OTU6 (5 clones) was associated with type II *Methylocystaceae* methanotrophs, and were closely related to *pmoA* from *Methylocystis parvus* (AAQ10310), with one of deduced amino acid sequences (clone 20A2) sharing 100% amino acid sequence identity with the *Methylocystis parvus* sequence.

Methanotroph community analysis from 16S rRNA biomarker. 16S rRNA gene fragments were PCR-amplified from gDNA extracted at two critical points of the water column, e.g at 62 m depth corresponding to the oxic-anoxic interface and at 70 m depth in the anoxic water layer in order to confirm *pmoA* results. In summary, 135 clones were sequenced, which clustered into 42 distinct OTUs (threshold $\geq 97\%$ sequence similarity). The relative abundance of dominant bacterial varied vertically with *Beta*-, *Epsilon*- and *Gammaproteobacteria* highly abundant at the oxic-anoxic interface and both *Actinobacteria* and *Verrucomicrobia* increasing sharply with the decreasing of oxygen concentration at 70 m (Fig. 9). Most of *gammaproteobacteriales* clones (79%) were related to type I methanotroph sequences which were distributed into three distinct OTUs and matched most closely with the type strains of *M. psychrophilus* (97 to 99% similarity) and *M. tundripaludum* (95% similarity).

Discussion

Methanogenesis in Lake Pavin

In this study, we confirm that methanogens present in the water column of Lake Pavin are metabolically active (Fig. 4 and 5). This finding is in agreement with the Lopes' model (Institut de Physique du Globe de Paris, personal communication) which suggests that this compartment could contribute to 20% of total CH₄ production. Although a same trend was described by Winfrey and Zeikus (1979) and Iversen *et al.*, (1987) for Knaack Lake and Big Soda Lake, respectively, CH₄ produced by lakes seems mainly due to the CH₄ flux from the sediment. The absence of sulfate and nitrate in the bottom waters of Lake Pavin corroborates this assumption (Michard *et al.*, 1994)

Most of the *mcrA* OTUs identified in this study belonged to *Methanomicrobiales* order. They were widely dominant in all water samples tested and highly diverse compared to those belonging to *Methanosarcinales* order. Additionally, as the closest relative of *Methanomicrobiales* sequences is the hydrogenotrophic species, *Candidatus Methanoregula boonei*, it is likely that phylotypes present in Lake Pavin are hydrogenotrophic. However, this assumption remains unconfirmed (Fig. 3). The hydrogenotrophic methanogenesis could be, therefore, the main CH₄ production process in water column. In contrast, in sediments, the number of clones related to *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales*, was almost equivalent. As suggested by Schwarz *et al.*, (2007), members of these two orders could be efficient syntrophic partners in the complete degradation of organic biomass in freshwater sediments.

Several studies report a higher involvement of hydrogenotrophic methanogens in CH₄ production as compared with acetoclastic methanogens (Schwarz *et al.*, 2007; Nettmann *et al.*, 2008). Although our study supports this observation, this contrasts with studies based on 16S rDNA which suggested that the acetoclastic methanogens dominated water column and sediment-water interface of Lake Pavin (Lehours *et al.*, 2005; Lehours *et al.*, 2007). This difference could be explained by bias in the PCR where some sequences are amplified in preference to others. Bias in PCR has been observed when amplifying 16S rRNA genes where a single universal primer is used, leading to significant underestimation of true community diversity at all levels of taxonomic hierarchy (Jeon *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). The acetoclastic methanogenesis pathway is also supported by a study using carbon isotope

fractionation of acetate (Whiticar, 1999). Goevert and Conrad (2008) showed, however, that the sulfate reducer *Desulfobacca acetoxidans*, which uses the acetyl-CoA pathway, had a similar fractionation as acetoclastic methanogens using the same pathway. Both types of microorganisms were identified in the water column of Lake Pavin (Biderre-Petit *et al.*, 2010). Thus, carbon isotope fractionation of acetate in Lake Pavin may also be strongly dependent on the sulfate-reducing community oxidizing acetate.

The third lineage with two OTUs formed a deep branch with highest similarity to environmental *mcrA* sequences from various methanogen ecosystems. The species carrying these sequences are metabolically active, suggesting an involvement of this lineage in the CH₄ cycle. Although their closest relative is the anaerobic methane oxidizer ANME-1, no specific signature for this cluster was identified.

Aerobic methanotrophy in Lake Pavin

In this study, we show that aerobic methanotrophy occurs at the oxic-anoxic interface both with functional and phylogenetic biomarkers. This finding is also in good agreement with the Lopes' model (personal communication) which suggests that aerobic CH₄ oxidation is the main methane sink in the water column of Lake Pavin.

The planktonic methanotroph assemblages investigated by *pmoA* gene analysis showed that the oxic zone of the water column lodges methanotrophic bacterial species that fall into the types I, II and X methanotrophs (Fig. 6). Most of the clones obtained in this study were closely related to *Methylobacter* species, particularly *M. psychrophilus*. This is consistent with results from different marker analyses in a wide variety of ecosystems (Wartiainen *et al.*, 2003; Pester *et al.*, 2004; Nercessian *et al.*, 2005; Rahalkar and Schink, 2007; Kojima *et al.*, 2009a; Liebner *et al.*, 2009). These methanotrophs could be the key players in CH₄ oxidation regardless of selection pressure due to changes in O₂ and CH₄ concentrations. Moreover, in the present study, both 16S rRNA and *pmoA* biomarkers allowed the identification of three distinct phylotypes closely related to the genus *Methylobacter*: one more closely related to *M. psychrophilus* and two constituting a separate group within this cluster. These findings suggest *Methylobacter* forms a micro-diverse community at species level in this ecosystem. These results were confirmed by the RT-PCR approach used to characterize *pmoA* gene expression. Only *Methylobacter pmoA* transcripts were detected in the water column up to 65 m. This suggests that it was the predominant

active group in this ecosystem (Fig. 8). However, at 65 m, no O₂ could be measured, its concentration being below the detection limit (<1μM) (Fig. 2). As *Methylobacter* sp. has not been conclusively demonstrated to adapt to anaerobic conditions, an explanation may be that the microaerophilic microorganisms, in which *Methylobacter* species, could immediately consume the low amount of O₂ available in this zone by making it undetectable. Moreover, transcripts for OTU1 and OTU2 showed distinct distribution profiles along the water column, suggesting differences in their assemblage structure which could be in correlation with substrate availability or changes in physico-chemical parameters. This finding led us to speculate that the *Methylobacter* phylotype identified in the lower surface layer (OTU1) could be less sensible to O₂ concentration.

In terms of relative abundance, the number of sequences of *Methylosarcina* sp.-related type I methanotrophs, group B6-related type X methanotrophs and *Methylocystis*-related type II methanotrophs was only marginal. This is consistent with results obtained by Rahalkar & Schink (2007) and Nercessian *et al.*, (2005) from Lake Constance and Lake Washington, respectively. However, up to now, the B6 group and *Methylosarcina*-related sequences were only described in freshwater sediments and not in the pelagic water column (Pester *et al.*, 2004; Nercessian *et al.*, 2005; Rahalkar and Schink, 2007). Concerning type II methane oxidizers, it is generally assumed that they thrive in environments with high CH₄ and low O₂ concentrations (Hanson and Hanson, 1996). This is challenged by our results and those of several recent studies (Knief and Dunfield, 2005; Mohanty *et al.*, 2006). In our study, *Methylocystis* spp. was only recovered at 20 m, a zone that is O₂-rich but almost entirely CH₄-depleted. Therefore, this finding may reflect a limited activity of *Methylocystis* spp. in CH₄ oxidation in this ecosystem. Moreover, the distribution of all these phylotypes along the oxic water column did not appear random, with their disappearance at the same time as the decrease in oxygen concentration (Fig. 7). Finally, unlike *Methylobacter*, no transcript was detected for these phylotypes. This suggests that either the *pmoA* genes of these methanotrophs were not expressed or that their transcripts were present at levels below the detection limit of RT-PCR. A third explanation could be that these populations used another carbon source such as methanol or acetate (Dunfield *et al.*, 2010; Belova *et al.*, 2011) and did not therefore express *pmoA*.

Acknowledgements

We thank Yves Gamblin and Antonio Vieira from the IPGP mechanics workshop for custom-building the 1 L syringe water sampler. We also thank Maxime Ossédât for his efficient technical assistance. This study is supported by grants from Région Auvergne, from Clermont Communauté, from the PRAI e-nnovergne LifeGrid program and from the French National Research Agency (METHANOX and METHANOLAC programs). The number of contribution is IPGP: 2642.

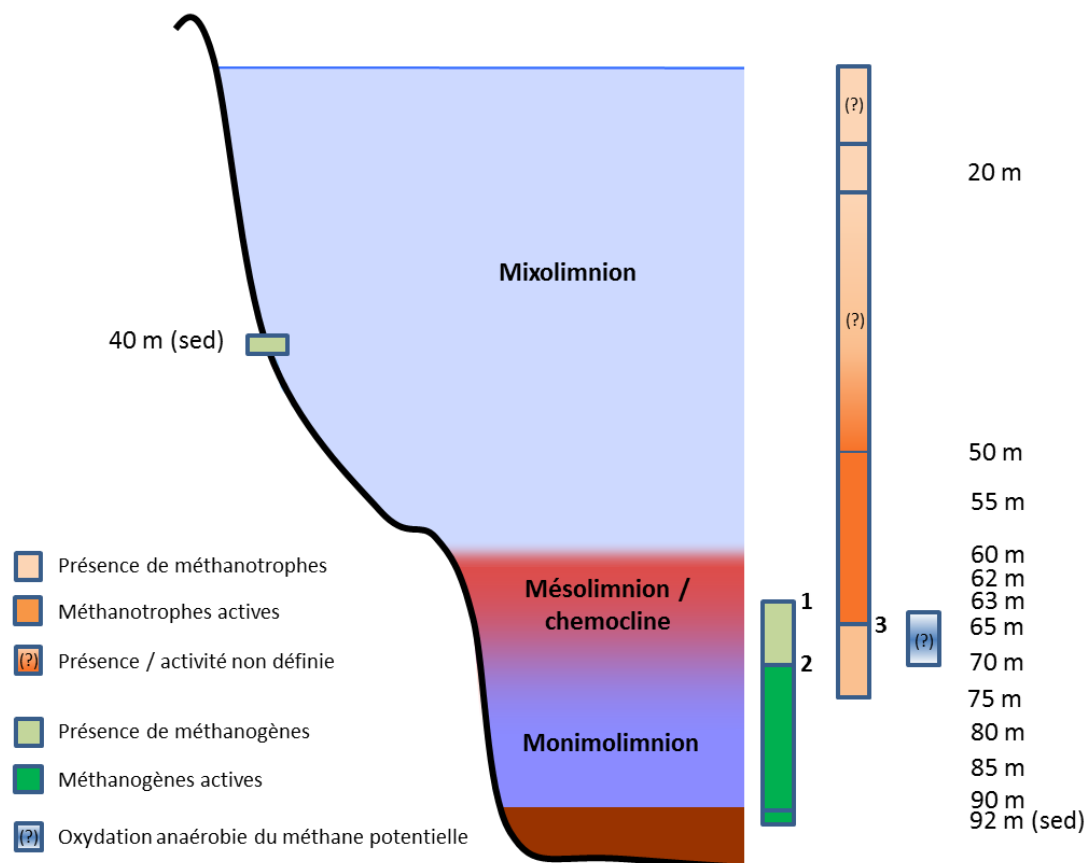


Figure 1 : Représentation schématique de la distribution des méthanotrophes aérobies et des méthanogènes dans la colonne d'eau du Lac Pavin. La présence des méthanogènes et des méthanotrophes est déterminée par l'analyse de séquences des gènes *mcrA* et *pmoA*, respectivement. L'obtention de séquences issues de transcrits de ces gènes détermine les zones où ces organismes sont probablement actifs.

Hypothèses sur les facteurs limitant la distribution et l'activité des méthanogènes et méthanotrophes :

- 1) possible seuil de toxicité de l' O_2 pour les méthanogènes au-dessus de 63 m.
- 2) pas d'activité des méthanogènes au-dessus de 70 m en raison de la présence d'accepteurs inorganiques d'électrons engendrant une compétition avec les bactéries ferro- et sulfato-réductrices pour l' H_2 et l'acétate.
- 3) pas d'activité des méthanotrophes en dessous de 65 m en raison de l'absence complète d'oxygène.

La zone d'oxydation anaérobie du méthane est potentiellement située entre les zones d'activité des méthanotrophes et des méthanogènes.

Etudes complémentaires sur les communautés méthanotrophes dans la colonne d'eau du Lac Pavin

Les résultats obtenus au cours de l'*étude 1* ont permis de déterminer la composition, la distribution et les zones d'activités potentielles des archées méthanogènes et des bactéries méthanotrophes aérobies dans la colonne d'eau et les sédiments superficiels du Lac Pavin (Fig. 1). Consécutivement à cette étude, des essais d'isolement de souches méthanotrophes aérobies et des approches écophysiologiques ont été réalisés afin de disposer de modèles cellulaires et d'apporter des informations complémentaires aux données d'écologie moléculaire. Des approches d'enrichissement et des études microcalorimétriques ont également été initiées afin d'appréhender le processus d'oxydation anaérobie du méthane dans le monimolimnion du Lac Pavin.

Les résultats obtenus, trop préliminaires pour faire l'objet de publications, ouvrent néanmoins des perspectives intéressantes, et seront présentés dans cette section, en liaison avec ceux obtenus dans l'*étude 1*.

I- Etude de la méthanotrophie aérobie dans la colonne d'eau du Lac Pavin par des approches culturelles et microcalorimétriques

I.1. Principales observations réalisées au cours de l'étude 1 ayant orienté les approches culturelles et écophysiologiques.

- Bien que la diversité phylotypique des méthanotrophes aérobies soit distribuée au sein des trois types de méthanotrophes affiliés aux *Proteobacteria* (type I, II, X), l'analyse des transcrits *pmoA* suggère que la majeure partie de l'oxydation aérobie du méthane est réalisée par un faible nombre de phylotypes affiliés au genre *Methylobacter* (type I).
- Les espèces affiliées à *Methylobacter* représentent généralement la majeure partie de la communauté de méthanotrophes aérobies des lacs de régions tempérées (Rahalkar and Schink, 2007; Kojima *et al.*, 2009b; Tsutsumi *et al.*, 2010).

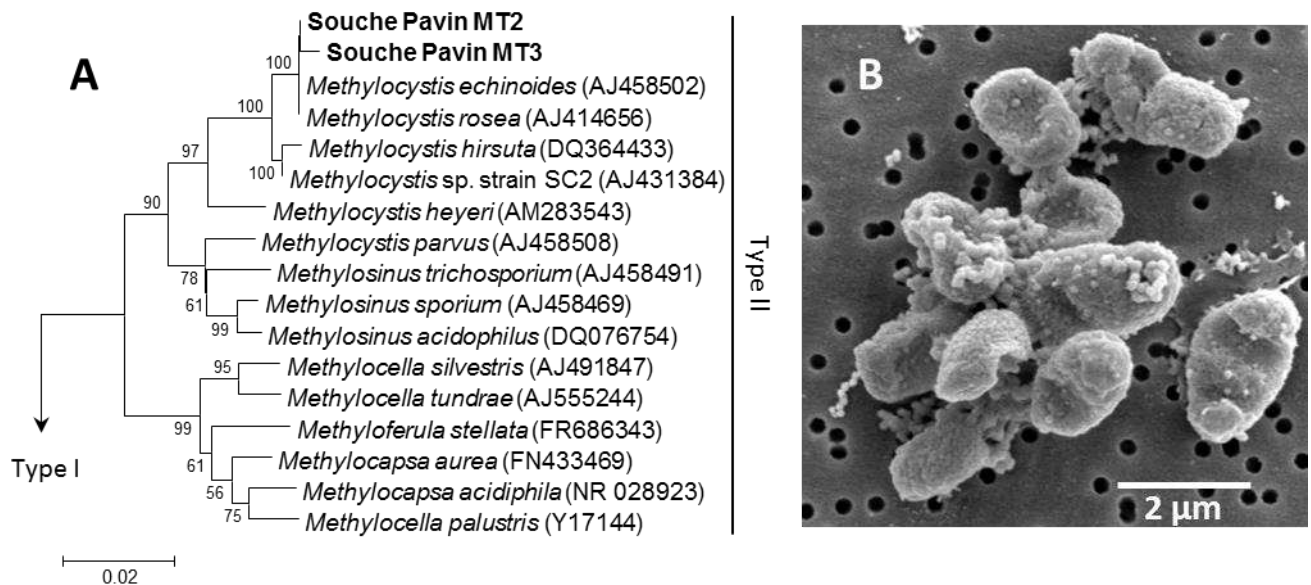


Figure 2 : Affiliation phylogénétique de 2 souches de méthanotrophes de Type II (MT2 et MT3) isolées du Lac Pavin (A). Arbre construit avec la méthode du neighbor joining, 1000 bootstraps. Observation en microscopie électronique à balayage (photo Claude Lebos, Université de Tours) de la souche MT3 (B).

- La température de la colonne d'eau, entre 4 et 5°C à partir de 20 m de profondeur, peut expliquer la prédominance de phylotypes proches d'espèce psychrophiles²⁸ dans la colonne d'eau du Lac Pavin. Cependant d'autres facteurs tels que la disponibilité en azote, méthane et O₂ interviennent probablement dans la distribution de ces phylotypes. Ces facteurs pourraient notamment expliquer la répartition dichotomique de l'activité des 2 phylotypes dominants entre 50 et 65 m de profondeur.
- L'amplification de transcrits *pmoA* à des profondeurs où les concentrations en oxygène et en méthane sont inférieures à 1 µM suggère que ces méthanotrophes possèdent une forte affinité pour ces substrats. Il ne peut cependant pas être exclu que les méthanotrophes situées dans ces zones se développent sur des composés organiques stockés dans leur cellule, tout en continuant à transcrire le gène *pmoA*.

I.2. Essais d'isolement de souches méthanotrophes aérobies et approches éco-physiologiques en microcalorimétrie.

I.2.a Objectifs

La mise en œuvre d'approches culturelles avait pour objectif d'enrichir et d'isoler des souches méthanotrophes aérobies afin de disposer de modèles cellulaires nécessaires aux approches écophysiologiques. Ces dernières visaient (1) à déterminer si les affinités de différentes souches pour le CH₄ et l'O₂, et leur capacité à utiliser des composés azotés variés (N₂, NO₃⁻, NH₄⁺), pouvaient en partie expliquer leur distribution le long de la colonne d'eau, (2) à établir des taux d'activité de méthanotrophie aérobie dans le but d'affiner la modélisation des flux de méthane dans cet écosystème.

Les échantillons destinés aux enrichissements ont été collectés dans les strates où une activité de méthanotrophie optimale (Cf. *Etude I*) avait été observée. Une large gamme de conditions culturelles a été réalisée en combinant des variations dans les paramètres suivants : température, concentration en nutriments, pH²⁹.

I.2.b Principaux résultats obtenus sur l'isolement de souches méthanotrophes aérobies

En dépit de la dominance du type I dans la colonne d'eau du Lac Pavin, les souches isolées à 62 m, MT2 et MT3, ont été affiliées au genre *Methylocystis* (type II, Fig. 2). Un biais

²⁸ *Methylobacter tundripaludum* et *Methylobacter psychrophilus*.

²⁹ Voir conditions de culture en annexe.

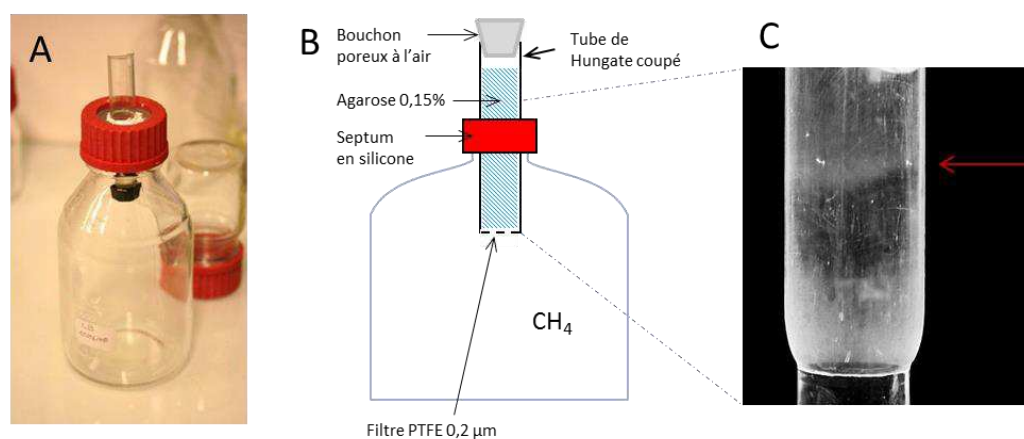


Figure 3 : Dispositif de culture en opposition de gradient de méthane et d'oxygène (A et B) et mise en évidence d'une bande de développement des méthanotrophes anaérobies MT3 au niveau de la confluence des 2 gradients (flèche rouge, C).

cultural d'enrichissement du type II en milieu liquide a été rapporté pour l'isolement de méthanotrophes aérobies du Lac Constance (Bussmann *et al.*, 2004). L'utilisation de cultures sur gradients opposés d'oxygène et de méthane en gel d'agarose semi-liquide (Amaral and Knowles, 1995) a cependant permis à ces auteurs d'isoler des souches de type I (Bussmann *et al.*, 2006). En effet, ce type de condition de culture est beaucoup plus proche des conditions rencontrées dans l'environnement et favorise les microorganismes se développant à de faibles concentrations en substrats.

Cette approche sur gradients opposés a été mise en œuvre afin d'enrichir des méthanotrophes de type I du Lac Pavin. Bien que le développement de méthanotrophes à la confluence de ces gradients ait été observé pour les souches de type II précédemment isolées (Fig. 3), l'isolement de nouvelles souches méthanotrophes de type I n'a pu être mené à son terme dans le cadre de cette thèse.

1.2.c Approches microcalorimétriques sur souches isolées

La microcalorimétrie (Fig. 4) permet de mesurer le flux thermique issu de l'ensemble des réactions cataboliques mises en jeu lors du fonctionnement cellulaire et sa grande sensibilité permet de détecter de très faibles variations d'activité. Des études en microcalorimétrie ont été réalisées afin de caractériser la réponse physiologique des souches MT2 et MT3 à différentes concentrations en méthane et oxygène. Les mesures ont été réalisées dans un microcalorimètre TAM 2277. Les ampoules (4 ml) placées dans le microcalorimètre contenaient 2 ml de milieu de culture liquideensemencé avec la souche méthanotrophe MT3. La culture a été placée sous agitation constante afin d'éviter la sédimentation des cellules au cours de la mesure. Les débits du flux de méthane et d'air ont pu être modulés indépendamment à l'aide de 2 pompes péristaltiques.

Ces approches préliminaires ont mis en évidence pour la souche MT3, isolée de la colonne d'eau du Lac Pavin, que :

- 1) L'utilisation de substrats gazeux est compatible avec les mesures microcalorimétriques. En effet, un flux thermique (P en μW , Fig/ 4), reflétant l'intensité de l'activité métabolique de la souche méthanotrophe a été détecté (Fig. 4).

A



B

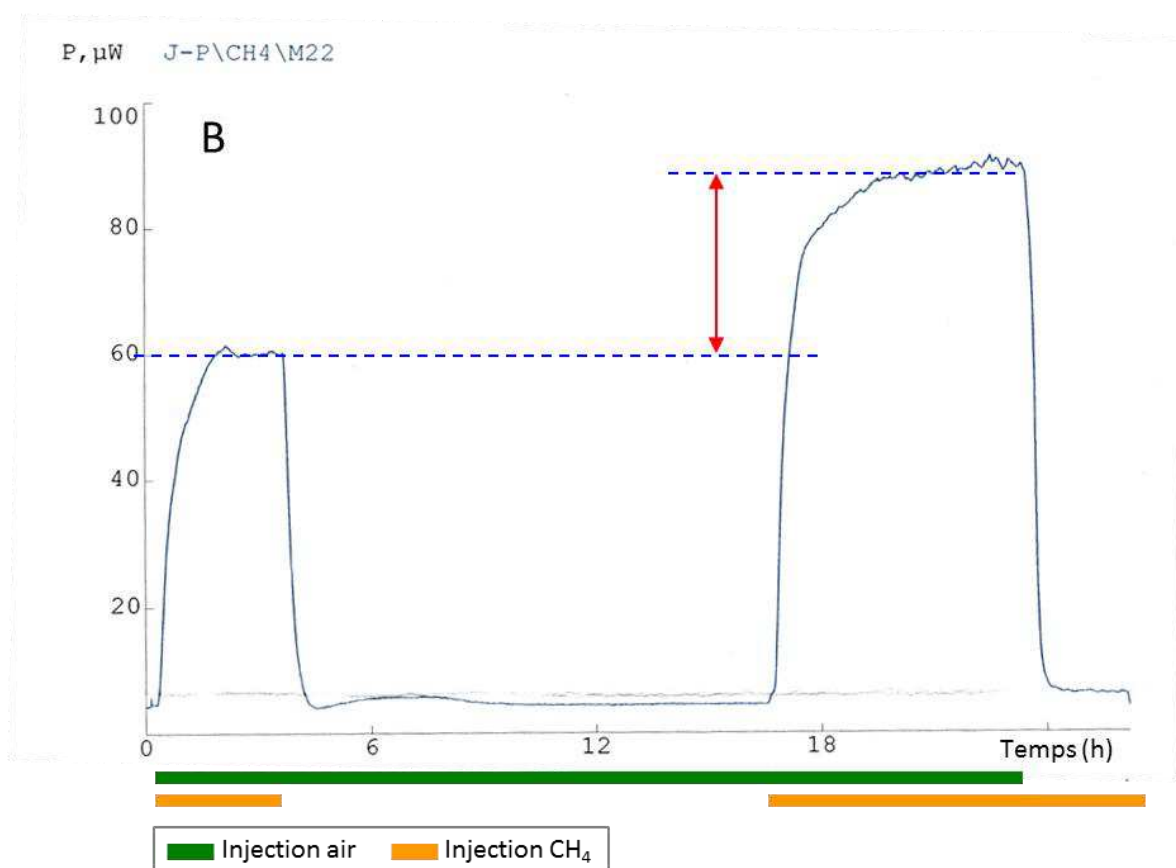


Figure 4 : (A) Microcalorimètre isotherme différentiel à flux de chaleur (TAM 2277 Thermometric). (B) Exemple de thermogramme obtenu lors d'incubation de la souche MT3 sous flux de CH_4 et/ou d' O_2 .

2) La réponse de la souche MT3 à l'apport de méthane est immédiat, même après une période de privation (Fig. 4), suggérant que :

- (i) les enzymes impliquées dans la voie catabolique de méthanotrophie sont synthétisées en permanence, même en l'absence de substrat. Cette hypothèse pourrait expliquer la détection des transcrits *pmoA* dans des strates où les concentrations en méthane sont très faibles (*Etude 1*).
- (ii) la souche MT3 présente des adaptations physiologiques lui permettant d'abaisser son énergie de maintenance en période de carence et donc de se maintenir pendant des durées importantes en phase stationnaire.

Bien qu'ouvrant des perspectives intéressantes sur la « mécanistique » de l'activité de méthanotrophie de ces souches, ce travail n'a pu être mené à son terme au cours de cette thèse. Néanmoins, il est poursuivi dans le cadre d'un post-doctorat, au sein de l'équipe Virus et Métabolismes Microbiens, afin de déterminer l'affinité de la souche MT3 pour l'oxygène et le méthane. Ces études permettront de comprendre la distribution spatiale du genre *Methylocystis* dans la colonne d'eau du Lac Pavin, et de déterminer l'impact écologique de ce genre dans les flux de méthane au sein de cet écosystème.

L'isolement et la caractérisation de souches méthanotrophes se poursuit également afin d'obtenir des modèles cellulaires de type I et d'entreprendre des études physiologiques sur des souches affiliées à ce genre dominant la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin.

II- Etude du processus d'oxydation anaérobie du méthane : enrichissements et approches microcalorimétriques

II.1. Données géochimiques suggérant l'existence de ce processus dans la zone anoxique du Lac Pavin

Les données géochimiques et la modélisation du transport réactif du méthane dans le Lac Pavin suggèrent qu'une partie du méthane produit dans le monimolimnion serait oxydé en condition anaérobie (Lopes *et al.*, 2011). La zone située entre 65 et 70 m, au sein de laquelle

les conditions environnementales ne sont pas favorables à l'activité des méthanogènes et des méthanotrophes aérobies (Fig. 1), pourrait offrir des conditions propices au développement de microorganismes réalisant l'oxydation anaérobie du méthane : anoxie, disponibilité d'accepteurs inorganiques d'électrons alternatifs à l'O₂, et concentrations importantes en CH₄.

II.2. Essais d'enrichissements de souches méthanotrophes anaérobies et approches microcalorimétriques sur échantillons naturels.

II.2.a. Objectifs et stratégie

Des cultures d'enrichissements et des approches microcalorimétriques sur des échantillons naturels complexes ont été mises en œuvre afin d'appréhender l'activité de méthanotrophie anaérobie.

De l'eau prélevée à 70 m et à 92 m, ainsi que des aliquotes issus d'une culture d'enrichissement démarrée 12 mois auparavant, ont été utilisés comme inocula pour les cultures d'enrichissements. Les mesures microcalorimétriques ont été réalisées sur des échantillons d'eau prélevés à 65 m et 70 m. L'ensemble des expérimentations a été réalisé en conditions anaérobies, depuis le prélèvement de l'eau jusqu'à son transfert en tubes ou ampoules de culture.

Les cultures d'enrichissement en batch ont été réalisées dans des tubes de Hungate, pressurisés sous 2 atm de CH₄/CO₂ (80:20) et contenant 1 ml d'inoculum dans 10 ml du milieu KJ³⁰ amendé avec un des accepteurs d'électrons suivant : NO₂⁻, NO₃⁻, Fe(OH)₃. Les cultures ont été incubées à 25°C pendant 3 mois avant la première mesure de la composition en gaz par chromatographie en phase gazeuse (microGC). Par la suite, des mesures ont été effectuées tous les 3 mois pendant 9 mois.

Les mesures microcalorimétriques ont été réalisées dans des ampoules de 4 ml fermées avec un septum en butyle épais permettant la mise en pression. Les ampoules ont été flushées avec du CH₄ ou du N₂ avant le transfert de 2,5 ml d'eau du lac à travers le septum. Les ampoules ont été pressurisées sous 1 ou 3 atm de CH₄ ou sous 1 atm de N₂ et ont été placées dans un microcalorimètre (TAM 2277). Les mesures ont été réalisées à 25°C.

³⁰ Voir composition du milieu KJ en annexe.

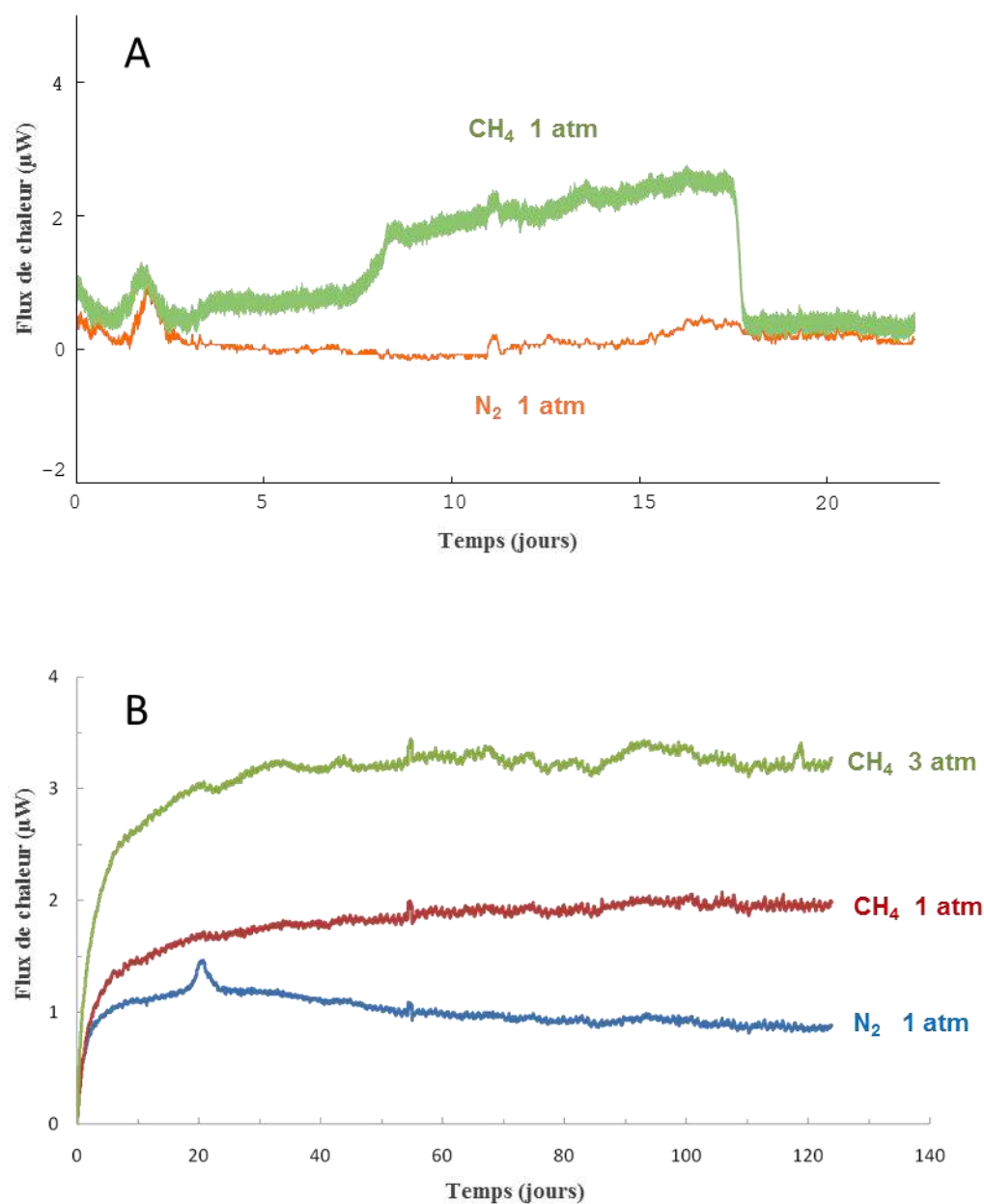


Figure 5 : Thermogrammes obtenus lors d'incubations d'eau de la zone anoxique du Lac Pavin sous différentes atmosphères gazeuses. Echantillons d'eau prélevés à 70 m (A) et à 65 m (B).

II.2.b. Résultats obtenus

- Aucune croissance visible, consommation du méthane ou production de CO₂, n'a été observée dans les cultures d'enrichissement, quel que soit l'accepteur d'électron testé.
- Les mesures effectuées en microcalorimétrie ont mis en évidence une activité métabolique plus importante dans les échantillons incubés sous 1 et 3 atm de méthane, en comparaison de l'incubation témoin (réalisée sous N₂). Après 7 jours d'incubation, le flux de chaleur est de 2,5 µW, 1,4 µW et 1,1 µW dans les ampoules pressurisées sous 3 atm de CH₄, 1 atm de CH₄ et 1 atm de N₂, respectivement (Fig. 5). Après 110 jours d'incubation, le flux de chaleur est de 3,3 µW et 1,9 µW pour les ampoules sous 3 et 1 atm de CH₄, respectivement, alors qu'elle diminue dans l'ampoule pressurisée sous N₂ (0,9 µW, Fig. 5).

Ces résultats, extrêmement préliminaires suggèrent que :

- Le CH₄ induit une activité métabolique dans les conditions anaérobies de l'étude.
- L'augmentation de la concentration en méthane dissous (fonction de la pression partielle en CH₄) pourrait stimuler ce métabolisme. Cette observation est en accord avec les résultats de Nauhaus *et al.*, (2002) qui ont mesuré un taux de méthanotrophie anaérobie 4 fois supérieur dans les cultures incubées sous 11 atm de CH₄ que dans celles incubées sous 1 atm de CH₄.

L'approche microcalorimétrique, initiée dans le cadre de l'étude de l'oxydation anaérobie du méthane, ouvre des perspectives intéressantes quant à l'optimisation de conditions d'enrichissement. En effet, des incubations dans le microcalorimètre, où les conditions suivantes seraient testées : accepteurs d'électrons préférentiels, pression partielle en méthane, et le suivi du flux de chaleur correspondant, permettrait de définir les conditions permettant d'enrichir de manière optimale les microorganismes méthanotrophes anaérobies.

Ce projet est actuellement poursuivi au sein de l'équipe Virus et Métabolismes Microbiens dans le cadre d'un post-doctorat. Ces études sont conduites sur des échantillons collectés dans la colonne d'eau et les sédiments du Lac Pavin, et sont couplées à des analyses de la composition isotopique des biomarqueurs lipidiques dans des incubations réalisées sous ¹³CH₄.

II.3. Recherche de séquences d'ARNr16S de la lignée Mx

II.3.a. Données bibliographiques et principales observations réalisées au cours de l'étude 1 ayant orienté cette étude.

Le processus d'oxydation anaérobie du méthane reste encore méconnu en milieu lacustre où il pourrait faire intervenir des microorganismes différents des ANME (Cf. 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique). En accord avec cette hypothèse, aucune séquence de *mcrA* obtenue au cours de l'étude 1 n'est affiliée aux ANME, bien que les amorces utilisées ciblent aussi ces lignées. Néanmoins, plusieurs séquences de *mcrA* sont affiliées à la lignée Mx (Cf. 1^{ère} partie de la synthèse bibliographique), définie par Mihajlovski *et al.*, (2008) et notée "NO" dans l'étude 1.

Aucun représentant de cette lignée n'étant encore cultivé, son rôle dans le cycle du méthane ainsi que les traits physiologiques qui lui sont associés ne sont pas encore déterminés. Les séquences les plus proches de Mx étant affiliées aux ANME-1, il est possible que des représentants de cette lignée puissent oxyder le méthane en anaérobie.

Le groupe Mx étant identifié en accord avec la phylogénie du gène *mcrA*, l'identité taxonomique de ces membres (selon la phylogénie ARNr16S) est encore incertaine. Il a néanmoins été proposé que les organismes présentant ces séquences *mcrA* puissent appartenir aux membres d'une lignée affiliée aux "Thermoplasmatales-related groups" (Mihajlovski *et al.*, 2008; Mihajlovski *et al.*, 2010). Cette lignée de "Thermoplasmatales-related group" potentiellement méthanogènes et/ou méthanotrophes sera appelée TPM dans la suite de cette section.

II.3.b. Objectifs et stratégie

L'objectif de cette étude était d'étayer l'hypothèse selon laquelle les Mx et les TPM forment une seule et même lignée et de discuter ainsi de l'implication possible de la lignée TPM dans le cycle du méthane.

Une amorce forward [293f (5'- CTTGAGAGAGGGAGCC -3')] ciblant spécifiquement l'ARNr16S des TPM a été dessinée à partir de 35 séquences affiliées aux TPM (issues de la base de séquence de NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et utilisée en complément de l'amorce universelle Archaea 136r (5'- GCGGTGTGTGCAAGGAGC -3'). L'ADN génomique extrait d'échantillons prélevés à 63 m (partie inférieure de l'oxycline à la

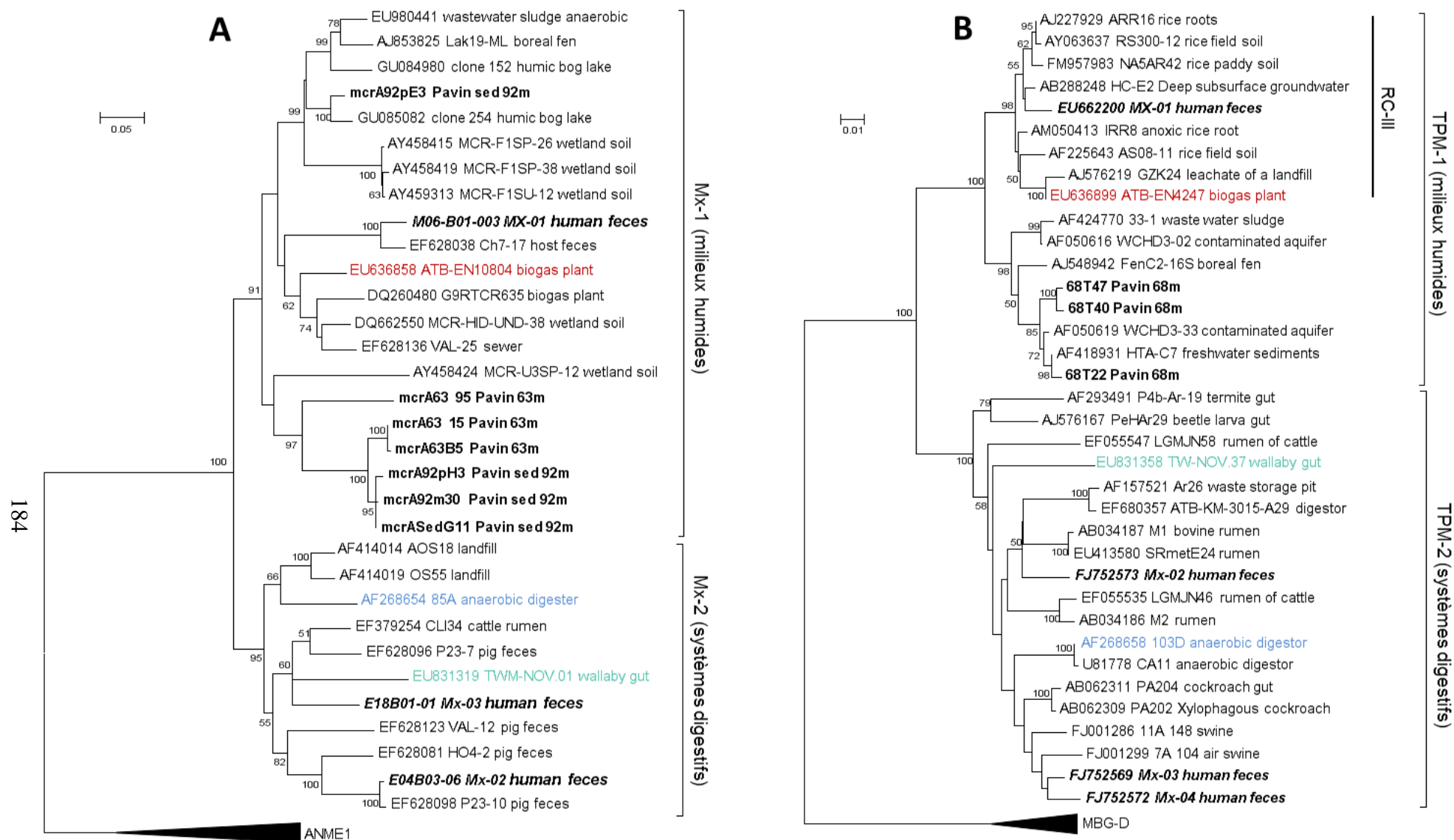


Figure 6 : Relations phylogénétiques entre archées méthanogènes/méthanotrophes dérivées du gène *mcrA* de Mx (A) et entre les "Thermoplasmatales-related group" potentiellement méthanogènes (TPM) dérivées du gène de l'ARNr 16S (B). Les séquences en gras et italique, proviennent de Mihajlovski *et al.*, (2008; 2010), les séquences en gras proviennent du Lac Pavin et les séquences de même couleurs montre la cooccurrence de *mcrA* de Mx et 16S rRNA de TPM dans une même étude. TPM-1 englobe RC-III définie par Grosskopf *et al.*, (1998). Les séquences ont été alignées avec clustal-W et les arbres ont été construits en utilisant la méthode du Neighbor-joining. Bootstrap = 1000.

date de prélèvement, le 28 avril 2008) et à 68 m a été amplifié avec des conditions standards (35 cycles, hybridation à 55°C) et les amplicons (1100 pb) ont été clonés et séquencés.

II.3.c. Résultats et discussion

- Amplification de la lignée TPM dans la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin :

Des amplifications positives de TPM ont été obtenues uniquement à partir des échantillons prélevés à 68 m de profondeur. Les séquences obtenues ont été affiliées à la lignée TPM. Ce résultat soutient l'hypothèse de Mihajlovski *et al.*, (2010), bien qu'il ne soit pas suffisant pour la valider.

- Distribution environnementale des séquences Mx et TPM

Des arbres phylogénétiques ont été réalisés à partir des séquences *mcrA* du groupe Mx et ARNr16S du groupe TPM. Ces arbres intègrent les séquences obtenues à partir des échantillons du Lac Pavin et des séquences issues de la base de données NCBI (Fig. 6). Les séquences *mcrA* et ARNr16S se distribuent au sein de deux sous-groupes : Mx-1 et Mx-2, et TPM-1 et TPM-2, respectivement (Fig. 6). Les sous-groupes TPM-1 et Mx-1 sont principalement composés de séquences issues d'environnements humides/aquatiques et les sous-groupes Mx-2 et TPM-2 de séquences issues de systèmes digestifs. En accord avec cette distribution, les séquences de TPM et de Mx du Lac Pavin sont affiliées aux groupes TPM-1 et Mx-1. Des études indépendantes portant sur des milieux différents (Nettmann *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2009; Mihajlovski *et al.*, 2010) avaient également rapportées une co-occurrence de séquences Mx-1 et TPM-1 ou Mx-2 et TPM-2 (Fig. 6). L'ensemble de ces observations soutient l'hypothèse de Mihajlovski *et al.*, (2010).

- La lignée TPM est-elle impliquée dans le cycle du méthane ?

Le clade TPM-1 inclut la lignée Rice-Cluster III (RC-III, (Grosskopf *et al.*, 1998)), caractérisée par Kemnitz *et al.*, (2005) à partir de cultures d'enrichissement. La croissance des représentants de la lignée RC-III est stoppée par l'ajout de 2-bromoéthane sulfonate (Kemnitz *et al.*, 2005) qui est un inhibiteur de la méthanogenèse (Gunsalus *et al.*, 1978) et de la

méthanotrophie anaérobie (Nauhaus *et al.*, 2005). Cette observation soutient l'implication de RC-III, et par extrapolation de la lignée TPM, dans le cycle du méthane.

- La lignée TPM pourrait-elle réaliser un processus d'oxydation anaérobie du méthane ?

Lehours *et al.*, (2005) avaient mis en évidence, par des approches d'hybridation *in situ* (sonde MB1174), un pic de densité de *Methanobacteriales* à l'interface oxydée/anoxique (Cf. présentation du site d'étude). Or, aucune séquence ARNr16S ou *mcrA* affiliée aux *Methanobacteriales* n'a été obtenue dans les banques de clones de la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin. Considérant que la lignée TPM est la seule lignée d'archées ciblée de façon aspécifique par la sonde MB1174 il ne peut être exclu que le pic de densité de *Methanobacteriales* observé soit lié à une détection aspécifique de TPM. Dans ce cas, la localisation des TPM à l'interface entre l'oxycline et le monimolimnion serait plus favorable à une activité de méthanotrophie anaérobie qu'à une activité de méthanogenèse (Lopes *et al.*, 2011).

Ces observations soutiennent l'implication de la lignée TPM dans le cycle du méthane mais restent spéculatives. En particulier quant à l'implication possible de cette lignée dans un processus d'oxydation anaérobie du méthane. Des études plus précises sur la répartition et sur l'activité des membres affiliés aux lignées Mx et TPM dans la colonne d'eau anoxique du Lac Pavin permettront d'accréditer ou d'infirmer ces hypothèses.

Discussion et Conclusion du chapitre 1

I- Méthanogènes et Méthanogenèse

En accord avec les travaux de Lehours *et al.*, (2007, 2005), la communauté méthanogène de la colonne d'eau est principalement composée de *Methanomicrobiales* et de *Methanosarcinales*. Les séquences de *Methanomicrobiales* appartiennent à la famille récemment décrite des *Methanoregulaceae* qui comprend des espèces hydrogénotrophes (Sakai *et al.*, in press). Les séquences de *Methanosarcinales* sont affiliées aux *Methanosaetaceae* dont les espèces isolées sont exclusivement acétotrophes (Ma *et al.*, 2006). L'acétate et H_2/CO_2 sont donc les principaux précurseurs de la méthanogenèse dans cette zone pélagique. Cependant, l'importance relative de ces 2 lignées dans la colonne d'eau n'est pas encore clairement définie. En effet, dans les banques de clones de l'étude 1, les *Methanomicrobiales* dominent les *Methanosarcinaceae* entre 63 m et 92 m. Dans l'étude de Lehours *et al.*, (2005), les densités de ces deux lignées sont équivalentes entre 64 m et 75 m, et *Methanosarcinales* dominant sous 85 m de profondeur. Lehours *et al.*, (2007) ont également observé une dominance des *Methanosarcinales* sur les *Methanomicrobiales* dans 2/3 des banques de clones de la colonne d'eau anoxique.

Ces disparités peuvent être expliquées par des biais liés à l'utilisation de sondes et d'amorces différentes entre ces 3 études. De plus, bien que les conditions soient extrêmement stables dans le monimolimnion (steady state, Cf. présentation des sites d'études), une dynamique saisonnière de l'abondance de ces 2 lignées ne peut être exclue. Cette hypothèse pourra être vérifiée par un suivi saisonnier de leurs abondances à plusieurs profondeurs (FISH, PCR quantitative). Leur contribution relative à la production de méthane devra également être suivie en réalisant des incubations en présence et en absence d'inhibiteur de la méthanogenèse acétoclaste (méthylfluoride, CH_3F) et de la méthanogenèse totale (2-bromoéthanesulfonate, BES) (Metje and Frenzel, 2007).

II- Méthanotrophes et méthanotrophie

La colonne d'eau du Lac Pavin héberge des populations de méthanotrophes aérobies diversifiées qui oxydent efficacement le méthane diffusant depuis le monimolimnion. Ces méthanotrophes, dominées par le genre *Methylobacter*, sont potentiellement capables de se développer à de très faibles concentrations en O_2 ou en CH_4 . En raison d'un biais cultural

favorisant le type II, la caractérisation physiologique d'espèces appartenant à la fraction dominante de la communauté méthanotrophe n'a pas pu être menée à son terme. L'utilisation de cultures sur gradients opposés de méthane et d'oxygène permettra peut-être d'accéder à la caractérisation d'espèces méthanotrophes de type I.

Les données géochimiques et la modélisation du transport réactif du méthane dans la colonne d'eau suggèrent qu'une fraction du méthane pourrait également être oxydée en anaérobie. Les mesures microcalorimétriques réalisées sur des échantillons d'eau provenant de la zone potentielle d'oxydation anaérobie du méthane (Lopes *et al.*, 2011) supportent cette hypothèse. Néanmoins, des investigations complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats. L'étude 1 a mis en évidence la présence d'une lignée encore énigmatique, Mx, qui semble correspondre à une lignée dénommée "*Thermoplasmatales*-related groups" (TPM) selon l'affiliation ARNr16S. Les membres TPM pourraient représenter une part importante de la communauté d'archées à certaines profondeurs de la colonne d'eau et être impliqués dans le cycle du méthane (méthanogènes ou méthanotrophes). En raison des fortes concentrations en méthane et des forts gradients en accepteurs inorganiques d'électrons potentiels (Cf. présentation du site d'étude), le Lac Pavin constitue un site privilégié pour l'étude de cette nouvelle lignée.

**CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES
COMMUNAUTES D'ARCHEES CANDIDATES
ET METHANOGENES DANS LES SEDIMENTS
DU MONIMOLIMNION**

- ETUDES 2 ET 3 -

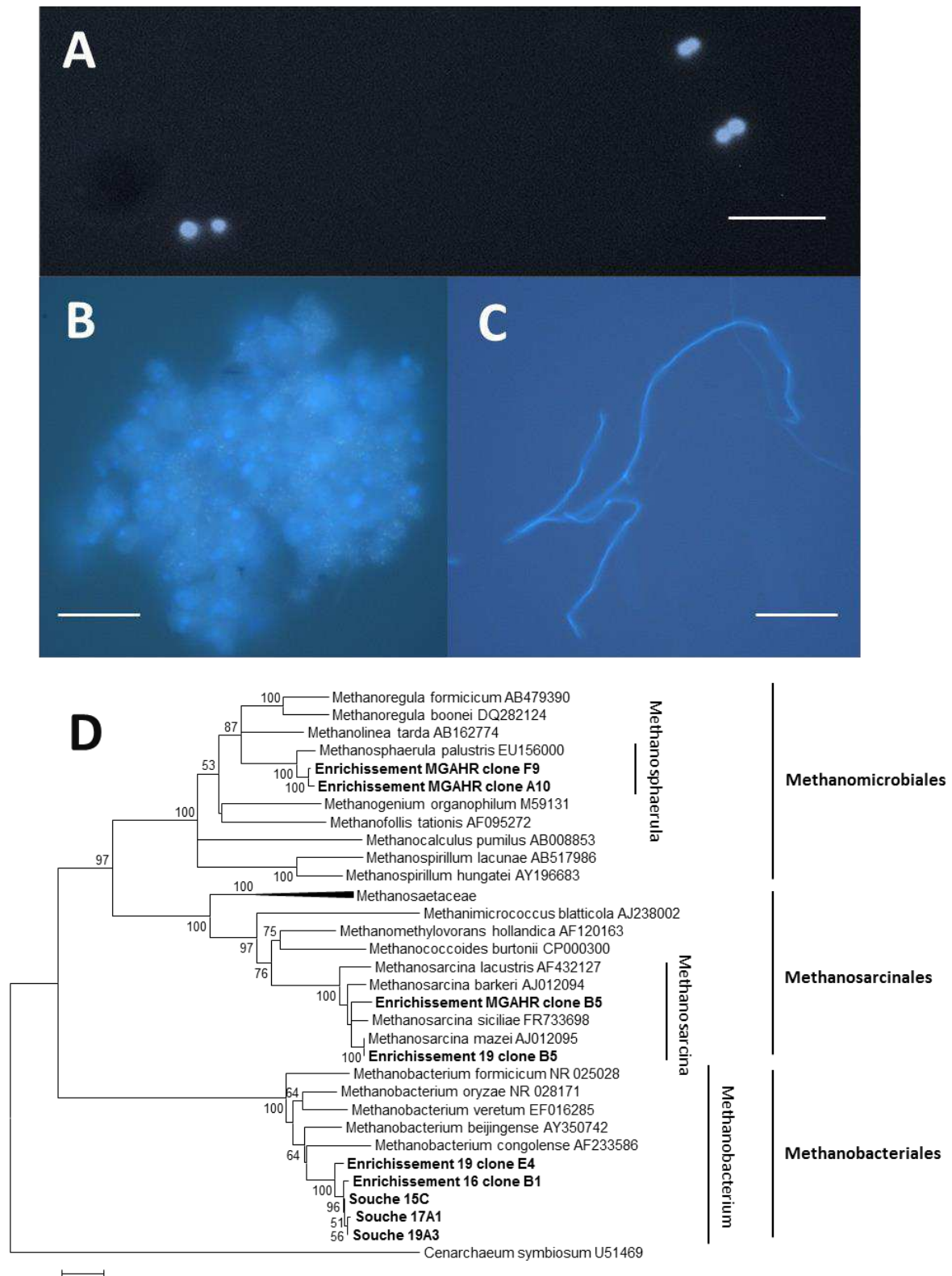


Figure 1 : Morphologies et affiliations phylogénétiques des méthanogènes enrichies et isolées à partir des sédiments du monimolimnion du Lac Pavin. Observation au microscope inversé en lumière UV (350 nm) révélant l'auto fluorescence du cofacteur F_{350} de (A) *Methanosphaerula* sp. (B) *Methanosarcina* sp. et (C) *Methanobacterium* sp., barres d'échelle 5 μ m. Positions phylogénétiques des méthanogènes isolées et présentes dans les cultures d'enrichissements (D). L'arbre a été construit avec la méthode du neighbor-joining et 1000 bootstraps.

Introduction

Les concentrations en méthane mesurées dans le sédiment, à la verticale de l'isobathe 92 m (profondeur maximale du lac, Cf. Présentation site d'étude) sont 2 à 3 fois supérieures à celles de la strate profonde du monimolimnion (92m). Ces données suggèrent que l'activité maximale de méthanogenèse pourrait se réaliser dans le compartiment sédimentaire profond.

La diversité, l'abondance, et la caractérisation taxonomique des communautés de méthanogènes ont seulement été déterminées au niveau de l'interface eau-sédiment (Lehours *et al.*, (2007) et dans l'étude 1) par des approches d'écologie moléculaire. Dans ce chapitre, les études présentées ont visé à appréhender la communauté méthanogène du compartiment sédimentaire par des approches moléculaires et culturelles.

Ainsi, la structure spatiale, la composition taxonomique et l'abondance de lignées de méthanogènes et de lignées archéennes candidates³¹, le long des 40 premiers centimètres de sédiment, seront présentées dans l'étude 2. En parallèle à cette étude, des approches culturelles ont été mises en œuvre afin d'enrichir et d'isoler des méthanogènes hydrogénotrophes et acétotrophes des sédiments du Lac Pavin. Plusieurs taxons de méthanogènes (*Methanobacterium*, *Methanosphaerula* et *Methanosarcina*) ont été obtenus en culture d'enrichissement (Fig. 1). Cependant, seules les méthanogènes affiliées au genre *Methanobacterium* ont pu être isolées et représentent des espèces procaryotiques encore non décrites. L'étude 3 présente une description formelle des caractéristiques phénotypiques d'une de ces souches, 17A1^T.

L'étude 2 a été soumise dans *PLoS ONE*

L'étude 3 a fait l'objet d'une publication dans *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

³¹ Lignée n'ayant aucun représentant cultivé.

Etude 2: Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages

Guillaume Borrel^{1*}, Anne-Catherine Lehours¹, Olivier Crouzet¹, Didier Jezequel², Karl Rockne³, Amélie Kulczak¹, Emilie Duffaud¹, Keith Joblin¹ and Gérard Fonty¹

¹ Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 24 avenue des Landais, BP 80026, F-63171, Aubière, France.

² Université Paris 7, Laboratoire de Géochimie des Eaux, Institut de Physique du Globe de Paris, UMR CNRS 7154, Université Paris 7 35 rue Hélène Brion, 75205 Paris Cedex 13, France.

³ Department of Civil and Materials Engineering, University of Illinois at Chicago, 842 West Taylor St., M/C 246, Chicago, IL, USA.

*Corresponding author: guillaume.borrel@univ-bpclermont.fr

Abstract

Information about the vertical repartition of archaeal lineages in freshwater sediments are scarce. In addition, and regardless to the environment, quantitative data on the spatial distribution of these lineages are also rare. In the present study we characterized the vertical changes in the archaeal communities of the deep sediment of the freshwater meromictic Lake Pavin. For that purpose, we performed an integrated molecular approach including fingerprint patterns (TTGE) and 16S rRNA gene analyses (cloning) on the overall archaeal community, and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) on *Bacteria*, *Archaea* and on the four dominant archaeal lineages. The changes in activity of the main archaeal lineages with depth were also quantified by RT- qPCR. .

Huge changes occurred in the structure and composition of archaeal assemblages along the sediment core. Methanogenic taxa (*i.e.* *Methanosaeta* and *Methanomicrobiales*) were progressively replaced by uncultured archaeal lineages (*i.e.* Marine Benthic Group-D (MBG-D) and Miscellaneous Crenarchaeal Group (MCG)) which are suspected to be involved in the methane cycle.

Introduction

The densities of viable prokaryotes in marine or freshwater sediments (between 10^9 and 10^{10} cells.cm⁻³ of sediment) have soon prompted microbiologists to consider the metabolic roles that sediment microbiota play in the cycling of nutrient elements (Oppenheimer, 1960): oxidation of deposited organic matter, regeneration of inorganic nutrients and transformation of those inorganic materials (Fenchel and Blackburn, 1979). To effect the complete mineralization of complex organic matter, a variety of anaerobic prokaryotes must operate in close interactions (Schink, 1988). Microbial interactions in anaerobic sediments are a classical example of microbial interdependency following the concept of the “anaerobic food chain” borrowed from ruminant microbiology (Hungate, 1966; Wolin, 1974). The processes may be viewed as sequential in space or in time, as recently deposited material moves deeper into the sediments and through different “microbial zones” with terminal electron accepting metabolisms including denitrification, iron reduction, sulfate-reduction and methanogenesis (Capone and Kiene, 1988).

Whereas these global patterns remain valid, research performed in the last two decades has extended our knowledge on the diversity and function of the sedimentary microbiota, particularly those of the “most enigmatic of life’s three domains”, the Archaea. A striking example is the discovery of the anaerobic methane oxidation process (AOM) performed by a microbial consortium involving the Anaerobic Methanotrophs (ANME) archaea in marine sediments (Hinrichs *et al.*, 1999; Boetius *et al.*, 2000; Orphan *et al.*, 2001), and probably others archaeal groups in freshwater systems (Schubert *et al.*, 2011). Another major advance is the identification of number of uncultured phylogenetic archaeal lineages with unknown functions in mesophilic and cold environments, including marine and freshwater sediments (reviewed in Teske and Sorensen, 2008).

But, in comparison to marine sediments, archaeal communities structure and composition were less documented in freshwater lake sediments and studies were mainly focused on the methanogenic archaea of the surficial sediment layer (Nüsslein *et al.*, 2001; Purdy *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2007; Conrad *et al.*, 2010; Haller *et al.*, 2010; Biderre-Petit *et al.*, 2011). Whereas a general view of the dominant archaeal groups inhabiting freshwater sediments has begun to emerge from these studies, knowledge is missing about how the overall dominant archaeal lineages might be affected and structured according to depth and changing environmental factors. Here, we studied archaeal communities along a 40 cm core in the anoxic sediments of the meromictic Lake Pavin which are permanently surmounted by a

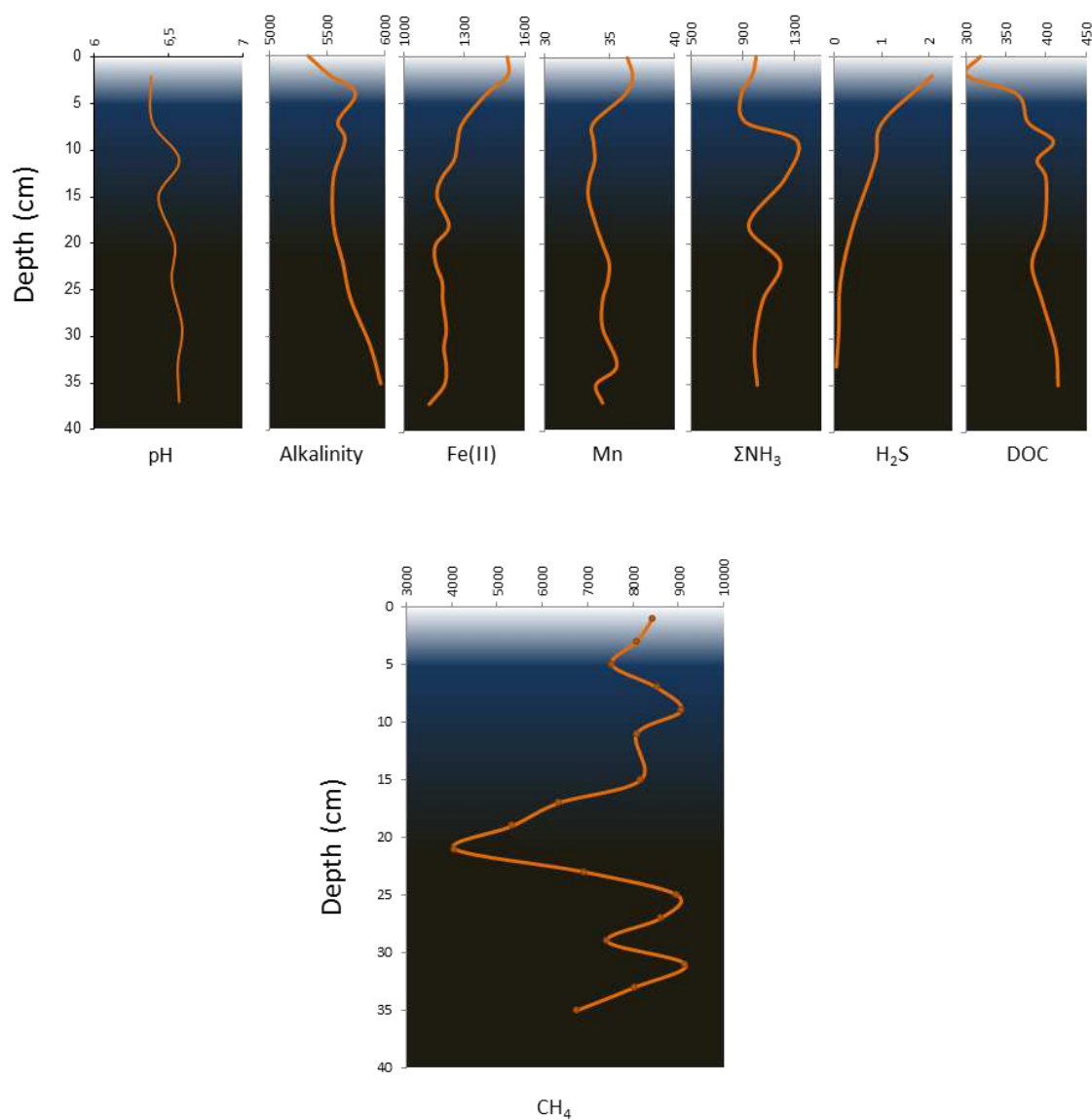


Figure S.1: Physico-chemical characteristics of the interstitial water of the profundal sediment (92 m); pH, alkalinity, concentration (μM) of reduced iron (Fe(II)), reduced manganese (Mn), ammonium (NH_3), hydrogen sulfide (H_2S), dissolved organic carbon (DOC) and methane (CH_4).

30 m anoxic water column (monimolimnion). This freshwater sediment system is then unusual and provides a special opportunity for investigations of the sediment microbiota, *e.g.* stability of physical parameters (temperature, sedimentation rates), steady state of the above anoxic water column, low availability of inorganic electron acceptors. An integrated fine-scale microbial community structure analysis was performed, using multiple molecular approaches including fingerprint patterns, quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and 16S rRNA analyses, to gain accurate information on the archaeal communities inhabiting freshwater sediments and their relationship to changes in the organic matter content of the sediment.

Experimental procedures

Site description

Lake Pavin, located at 45°55 N and 2°54 E, is the youngest volcano crater lake in the French Massif Central (6,000 years BP). Lake Pavin has a circular shape, an area of 0.44 km² and a maximum depth of 92 m at an elevation of 1,197 m above sea level. It is characterized by the presence of two permanent stratified layers. The upper layer (mixolimnion) extends from the surface to a 60 m depth and is affected by mixing during fall and spring. The deepest layer (monimolimnion) extends from 60 to 90 m in depth and includes the chemocline (60- to 70-m depth). Methane and dissolved inorganic carbon (DIC) reach 4 mM and 12 mM respectively at the water-sediment interface (Assayag *et al.*, 2008). Below 65 m sulfate concentration is < 3 µM. In the sediment pH is slightly acid (6.3 to 6.5), and temperature is constantly low (5 °C) (Viollier personal communication). Profiles of methane and some inorganic compounds previously measured in these sediments are presented in Fig. S.1.

Sampling procedure

A 40 cm sediment core was sampled in December 2007, at the maximum depth zone of the lake, using an Uwitech gravity corer. The sediment core was sectioned into two centimeters segments from the water-sediment interface to a depth of 19 cm and at 24-25, 28-29, 30-31, 36-37 cm depth and homogenized aseptically. Sub-samples of the homogenized sections were stored at -20 °C. Another sediment core was collected in December 2009 using a Uwitech gravity corer for 16S rRNA quantification, and organic matter quantification. The sediment core was sectioned in 1 cm intervals and was subsampled at 0-3, 4-7 and 10-13 cm depth and homogenized for analysis. Samples were frozen in the field and kept at -80°C until RNA extraction.

Approach	Targeted group	Primer sets	Sequence (5' → 3')	Amplicon size	Annealing T°C	Reference
Cloning	Archaea	21f 1386r	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA GCGGTGTGTGCAAGGAGC	1360	60	Delong <i>et al.</i> , 1992
TTGE	Archaea	934fGC* 1386r	GAATTGCGGGGGAGCAC GCGGTGTGTGCAAGGAGC	490	60	Skillman <i>et al.</i> , 2004
qPCR	Bacteria	BAC338f 515r	ACTCCTACGGGAGGCAG ATTACCGCGGCTGCTGGCA	470	60	Yu <i>et al.</i> , 2005 Lane <i>et al.</i> , 1985
	Archaea	934f 1040r	GAA TGGCGGGGAGCAC GGCCATGCACCWCCTCTC	105	60	Skillman <i>et al.</i> , 2004 Reysenbach and Pace 1995
	Crenarchaeota	771f 957r**	ACGGTGAGGGATGAAAGCT CGGCGTTGACTCCAAT R	227	60	Ochsenreiter <i>et al.</i> , 2003 modified in this study
	Methanomicrobiales	MMB282f MMB832r	ATCGRTACGGGTTGTGGG CACCTAACGCRCATHGTTTAC	506	60	Yu <i>et al.</i> , 2005
	Methanosaetaceae	Mst702f Mst862r	TAATCCTYGARGGACCACCA CCTACGGCACCRCACMAC	164	60	
	MBG-D	490f 818r	GAGAGTAAGRGCTGGGTA ACTAACATCAAGCRAGCAG	348	58	This study

Table 1: Primers and amplifications features used in this study. * GC clamp at the 5-end: CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG (Muyzer *et al.*, 1993). ** the “R” in bold replace a “G” in the original primer.

Organic carbon analysis

Organic carbon and organic matter were measured using a modification of the procedure outlined in Buckley *et al.*, (2004). Homogenized sediment was sub-sampled volumetrically (3 mL) and dried to constant mass for analysis of bulk density, water content, and porosity using standard methods. Dried sediment aliquots were placed in an acid fumer for 24 hr to remove inorganic carbon and subsequently dried. These samples were split for organic carbon analysis using a Carlo Erbo elemental analyzer, or combusted at 375 °C for 24 hr in air for the oxidation of heat-labile organic matter components as described (Buckley *et al.*, 2004). The latter fraction is operationally termed “organic matter” as described previously (Buckley *et al.*, 2004).

DNA and RNA extraction

Genomic DNA was extracted using the Ultra clean® soil DNA extraction kit (MOBio Laboratories, Inc) according to the manufacturer’s instructions. Total RNA was extracted and separated from DNA as described by (Purdy *et al.*, 1996). Residual DNA was digested with Ambion® TURBO DNA-free kit (Applied Biosystems) according to rigorous DNase treatment protocol. According to this procedure the step of DNA digestion was repeated one more time and the volume of DNAase inactivation reagent was doubled.

Clone libraries construction and phylogenetic analyses

Archaeal 16S rRNA genes (hereafter referred to as “16S rDNA” for a better distinction with 16S rRNA transcripts) were amplified using the set of primers 21f and 1386r (Table 1). The PCR reaction mixture (50 µl) contained 5 µl of 10 X reaction buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 µl of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eurobio), 200 nM of each primer, 250 ng/µl of bovine serum albumin (BSA), 1.5 U of Taq Hotstar (Qiagen) and 1 µl of genomic DNA.

Amplifications were performed with a PTC-200 thermal cycler (MJ Research) using the following program: a 15 min hot start at 95 °C, followed by 35 cycles consisting of denaturation (1 min at 95 °C), annealing (1 min at 58 °C) and extension (1 min at 72 °C), with a final extension for 10 min at 72 °C. PCR products were cloned using a TOPO TA cloning Kit according to the manufacturer’s instructions (Invitrogen). Cloned inserts were PCR amplified using the M13 forward and reverse primers and amplicons were digested with the restriction endonuclease HaeIII (Qbiogene) at 37 °C for 12 h. Digests were analyzed by gel electrophoresis using 2.5 % (wt/vol) Nusieve 3:1 agarose (Tebu-Bio) gels containing ethidium

bromide (0.5 mg.L⁻¹) normalized with a 100 bp size marker (Invitrogen). Visual analyses of restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns were performed and banding patterns were grouped according to similarity. Plasmid DNAs from representative of each RFLP pattern were isolated using the QIAprep plasmid purification kit (Qiagen, Chatsworth, Calif.). Clones were sequenced by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and clone libraries were screened for chimeric sequences with the Bellerophon program available at <http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl> (Huber *et al.*, 2004).

Sequences were compared to available databases using the BLAST network service to determine approximate phylogenetic affiliations. Sequences were aligned with CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), and phylogenetic trees were computed using neighbor-joining approaches with MEGA 5 software (available at <http://www.megasoftware.net/>; (Tamura *et al.*, 2011)). The robustness of inferred topologies was tested by bootstrap analysis and 1000 resamplings of trees. Sequences exhibiting more than 97 % of similarity were grouped into the same Operational Taxonomic Unit (OTU). Coverage values of clone libraries were calculated as previously described (Hill *et al.*, 2003). Sequences were deposited in Genbank under accession no. GU135459 - GU135502. Sorensen similarity (Cs) and Bray Curtis dissimilarity indices were calculated as previously described (Magurran, 1988).

Temporal Temperature gel Gradient Electrophoresis (TTGE) analysis

Archaeal 16S rDNA were amplified using the set of primers 934f-GC/1386r (Table 1). Reaction mixture (50 µl) contained the same component as described above (see clone library construction). A touch-down PCR was performed using the following program: a 15 min hot start at 95 °C, 5 cycles consisting of denaturation (1 min at 95 °C), annealing (1 min at 65 °C) with a decrease of 1°C per cycle, and extension (1 min at 72 °C), followed by 30 cycles consisting of denaturation (1 min at 95 °C), annealing (1 min at 60 °C), and extension (1 min at 72 °C), with a final extension for 10 min at 72 °C. PCR products were quantified with the DNA quantitation kit fluorescence assay (Sigma-Aldrich®) and 300 ng of each sample were electrophoresed through a 8% Polyacrylamide gel (TAE 1.25x, urea 7 M, Temed 0.06 %, ammonium persulfate 0.0625 %) as previously described (Batisson *et al.*, 2007). Band patterns were analyzed using the GelCompare 4.6 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A 1 % band position tolerance (relative to total length of the gel) was applied in band assignment, which indicates the maximal shift allowed for two bands in different TTGE tracks to be considered as identical. Pairwise similarity matrices were calculated using the Jaccard equation from presence/absence data. Dendrograms were generated using UPGMA

	primer 490f GAGAGTAAGRGCTGGGTA	primer 818r CTGCTYGCTTGATGTTAGT
<u>Thermoplasmatales and related</u>		
MBG-D (GU135475)	AGAGAGAGTAAGAGCTGGGTAAGA...	...ACGCTGCTTGCTTGATGTTAGTCGG
MBG-D (GU135478)	AGAGAGAGTAAGGGCTGGGTAAGA...	...ACGCTGCTTGCTTGATGTTGGTTGG
MBG-D (AM229247)	AGAGAGAGTAAGAGCTGGGTAAGA...	...ACGCTGCTCGCTTGATGTTAGTTGG
Ferroplasma acidiphilum (AF513710)	ATG AGGA ATAAGTGCTGGGTAAGA...	...ACAT TGCCCAT TTGATGTT GCT TTT
TMEG (AF050616)	CGG AGA AGTAAGGGCCGGGTAAGA...	...ACGCTG CGG GCTTG GT GTT GGG GGT
RCIII (AJ608190)	AGG AGG AGTAAGGGG CG GGGTAAGA...	...ACGCTG CGG GCTTG GT GTT GGG GGT
<u>Other Euryarchaeotal lineages</u>		
Uncult <i>Methanoseata</i> (GU135459)	TTG CAT AG CA AGGGCCGGG CA AGA...	...ACG ATA CTCGCT AGG TGT CGG CCAC
<i>Methanoregula formicicum</i> (AB479390)	AGG CGG AG AA AGGGCCGGG CA AGA...	...ACG ATG CGCGT TAGG TGT ATC GGTG
Uncult <i>Methanospirillaceae</i> (GU135463)	TGG TGA AG AA AGGGCCGGG CA AGA...	...ACG ATG CGCGT TAGG TGT GTC AGTG
RCV (GU135468)	TCG AAG AATAAG TG ATGGG CA AGA...	...ACGCTG TAAG CAAGGC GTTG CAAAAT
DSEG (GU135469)	TCC AAG AATAAG TG GTGGGTAAGA...	...ACG ATG CCCACT AGAC ATTGG CA AT
Val-III (GU135471)	TTGGAGA ATA AGGG GT GGGTAAGA...	...ACG ATG CCCGT TTT GGTGT TGCA AAC
<u>Crenarchaeota</u>		
MCG / group I.3 (GU135481)	TGGGGGA ATA AGG AG AGGG CA AGT...	...ACG ATG CA GA CT AGG TGTT TGG ACG
MBGB/DSAG (GU135483)	CCG ATG AG AA AGG AG AGGG CA AGG...	...ACG ATG CGTGCT AGG TGTT GGT AGG
MBGA (GU135495)	CTGGGGA ATA AGGG AG GGG CA AGC...	...ACG ATG CA GG CT AGG TAA TAGG GAG

Figure S.2: Specificity and binding site (shading) of primers 490f and 818r that were used in real-time PCR shown on a partial alignment of representative archaeal 16S rDNA sequences from positions 490 to 508 and from 818 to 837 (*E. coli* numbering), respectively.

method (Ward, 1963). A distance of 40 % was used to separate clusters in the hierarchical classification. Relationships among samples were visualized using the ordination technique multidimensional scaling (MDS) using a standardized stress with 1000 iterations computed with XLSTAT version 6.01. Analysis of similarity (ANOSIM, (Clarke and Warwick, 2001)) was used to test the hypothesis that communities within each cluster were more similar to each other than to communities in other clusters. The number of bands in a profile was expressed as the phylotype richness. The Shannon diversity index (H') was calculated from the number of band and their relative intensity.

Quantitative PCR and RT-qPCR analyses

PCR primer design and modification: qPCR primers 490f and 818r targeting MBG-D, designed in this study (Table 1, Fig. S2), were analyzed with Beacon Designer program (available at <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) in order to avoid hairpins, self- and heterodimers. Specificity of primers 490f and 818r was checked *in silico* using ProbeCheck ((Loy *et al.*, 2008), available at <http://www.microbial-ecology.net/probecheck>) queering RDP II database version 9.61 (Cole *et al.*, 2006). *In situ* analysis, performed by sequencing clone libraries constructed with the set of primers 490f and 818r (according to experimental procedure described above), confirmed primer specificity. The primer 957r targeting *Crenarchaeota* (Ochsenreiter *et al.*, 2003) was modified (R instead of G at the 3' end) in order to remove one mismatch with most of the *Crenarchaeota* sequences retrieved in clone libraries constructed in this study (Table 1). With this modification, the sequences of the main euryarchaeotal lineages found in Lake Pavin kept at least 4 mismatches with the 2 primers targeting the *Crenarchaeota*. In order to estimate the consequences of this modification, qPCR were performed with both modified and unmodified 957r primers on serial dilutions of plasmids containing 1380-bp partial 16S rDNA sequences of *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales* and MBG-D. Non-specific amplifications were above the detection limit of the method when concentrations of *Methanosaeta*, *Methanomicrobiales*, and MBG-D are at least one order of magnitude above those detected in Lake Pavin samples.

16S rDNA qPCR: *Archaea*, *Bacteria*, *Crenarchaeota*, *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales* and MBG-D were quantified by real-time PCR using specific set of primers (Table 1). Real-time quantitative PCR analysis was conducted with a Mastercycler ep *realplex* (Eppendorf) using MESA green qPCR Master mix Plus for SYBR assay

(Eurogentec). In each qPCR run, besides community DNA and negative controls, a recombinant plasmid, linearized with the endonuclease XbaI, containing the 1380-bp partial 16S rDNA sequence was quantified using Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen) and was 10-fold serially diluted in triplicates ranging from 10^2 to 10^9 genome equivalents and used as templates to determine the standard curves by plotting the threshold cycle (CT) value against the logarithm of copy numbers (log Co) of 16S rDNA in each dilution. Amplification reactions contained the following: 12.5 µL of MESA green qPCR Master mix Plus for SYBR® assay (Eurogentec), 400 mM of each primers, $250 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ of BSA, 2 µL of DNA template and water to a 25 µl final reaction volume. Runs were performed under the following conditions: a denaturation (5 min at 95°C), followed by 40 cycles of (30 s at 95°C), annealing (20 s at various temperatures (Table 1)), extension (30s at 72°C), detection of SYBR green I signal measurement at (20 s at 80°C) and a last step of final extension at (10 min at 72°C). Melting curve analysis was performed at the end of 40 cycles to ensure the proper amplification of target fragments and to investigate the differentiation of the 16S rDNA retrieved from the environmental samples. Fluorescence readings were consecutively collected during the melting process from 60 to 95°C. Fluorescence data were converted into melting peaks. All data were analyzed using Mastercycler ep *realplex* software (Eppendorf). CT values were used to determine the copy numbers of 16S rDNA in the environmental samples based on the standard curve. All quantifications were performed in duplicates. The number 16S rDNA copies was converted into cell number assuming 2 and 3.8 copies of the 16S rDNA per archaeal and bacterial cell respectively (Klappenbach *et al.*, 2000).

16S rRNA RT-qPCR: RNA extracts were diluted (1, 10 and 100 fold) and cDNA of archaeal 16S rRNA (16S rcDNA) was obtained by using 1386r primer and the superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Control amplifications with 21f and 1386r primers were carried out on samples treated with DNase before and after reverse transcription to check the purity of cDNA. Conditions for qPCR were similar as previously described for 16S rDNA (see above).

Statistical analyses

Box plots of and Spearman's rank correlation were performed using Past software (Hammer *et al.*, 2001) available at <http://folk.uio.no/ohammer/past/>.

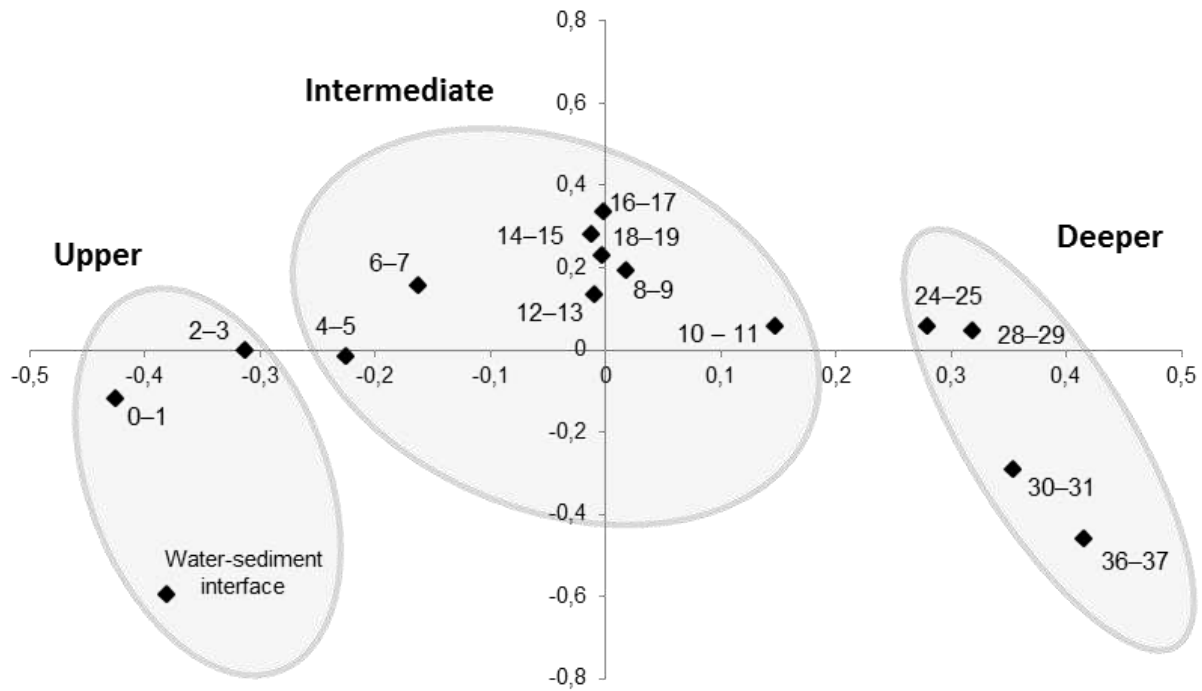


Figure 1: Multidimensional scaling plot (MDS) of the archaeal community based on TTGE on 16S rRNA genes. This plot corresponds to a two-dimensional visualization of the Jaccard distance matrix. The ellipses designate clusters of depth with > 55% similarity and delineate the upper layer (0 – 3 cm depth), intermediate layer (4 – 19 cm depth) and deeper layer (25 – 37 cm depth) of the core.

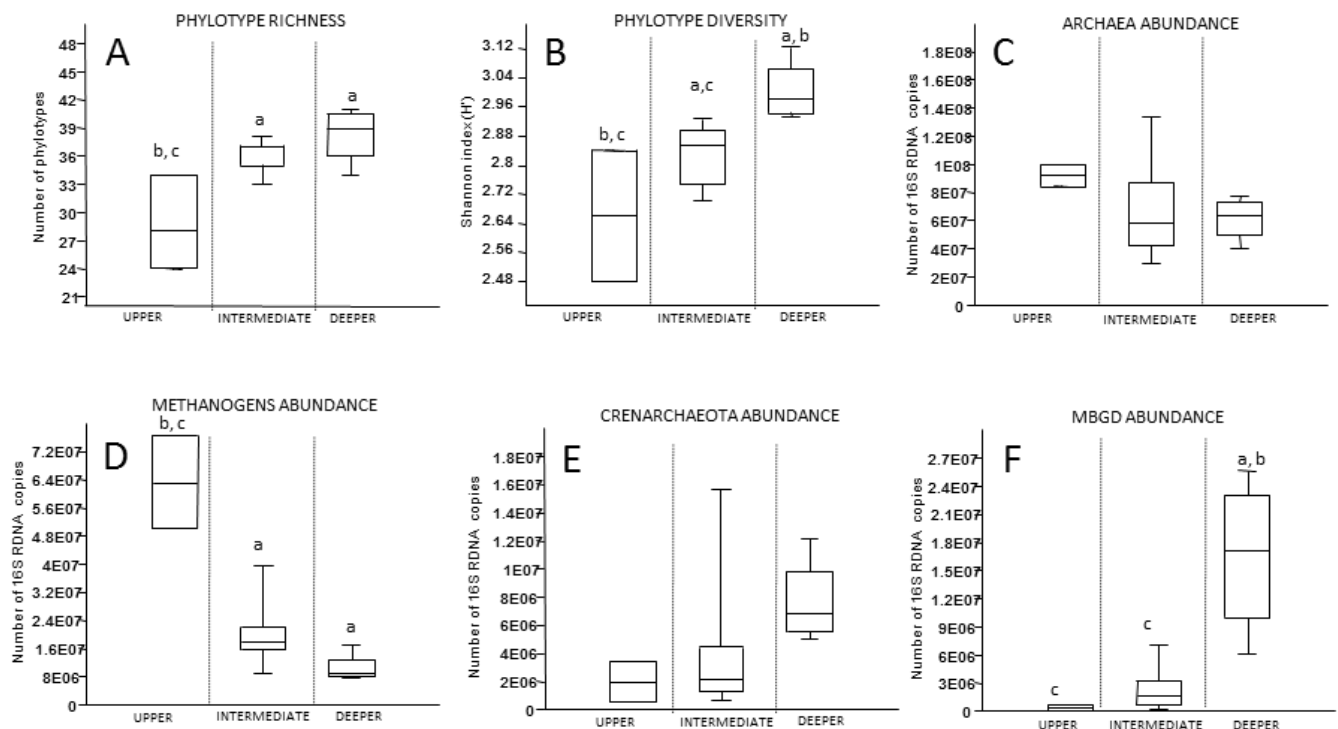
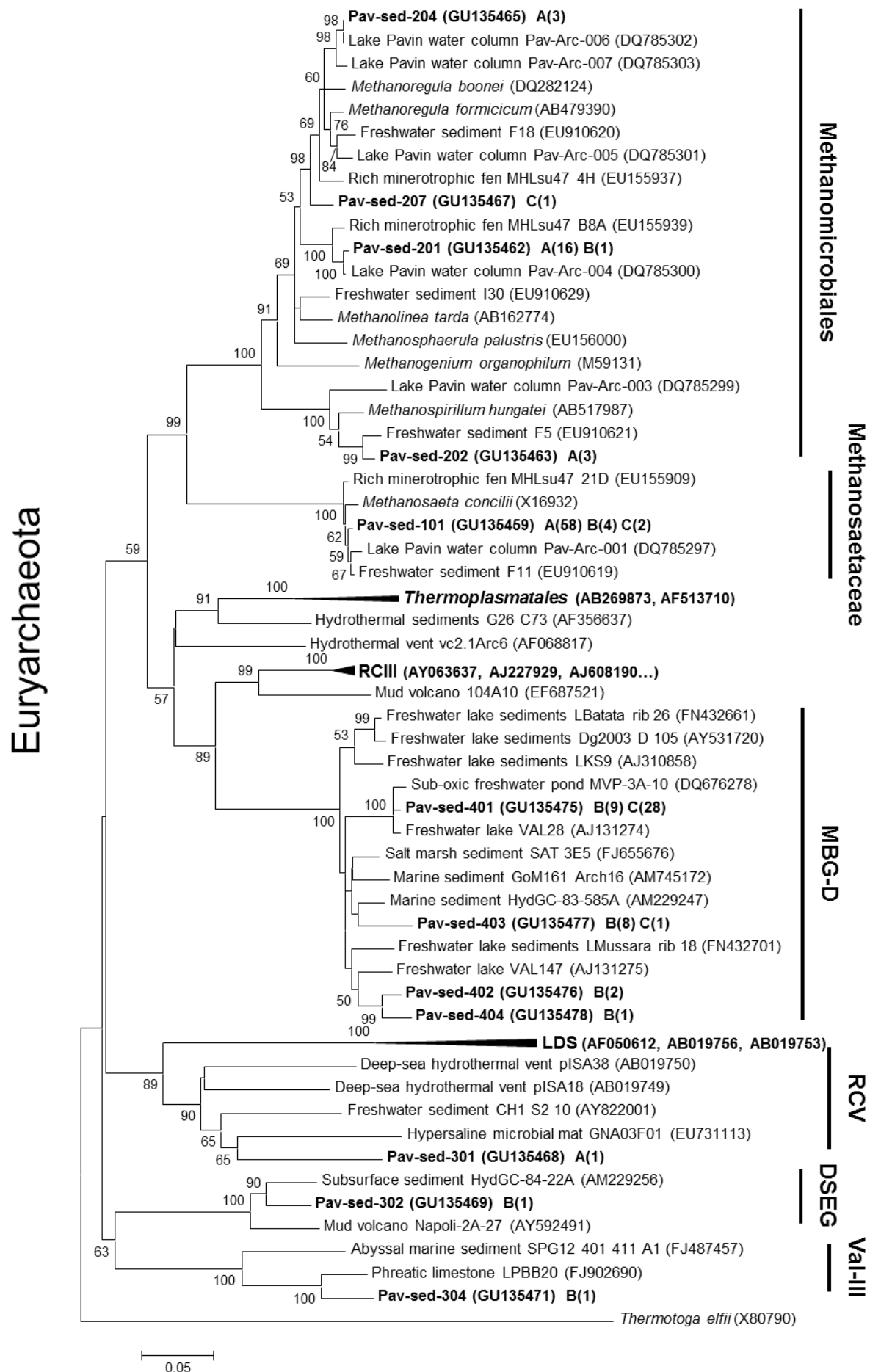


Figure 2: Box plots. Phylogeny richness (A) and diversity (B), abundance of archaea (C), methanogens (D), crenarchaeota (E), MBG-D (F). The average values of each parameters (richness, diversity, abundances) are calculated for the three layers discriminated by TTGE analysis. a, b, c indicate significant differences ($p < 0.05$)

Results

Archaeal community structure and composition along the sediment core

Archaea, profiled by TTGE of amplified 16S rDNA fragments, exhibited gradual changes in community structure along the sediment core (data not shown). Groupings obtained from hierarchical cluster (data not shown) and from MDS (Fig. 1) analyses discriminated communities of the upper (0-3 cm depth) from those of the intermediate (4-19 cm depth) and of the deeper (24-37 cm depth) sediment layers. These groupings were confirmed with ANOSIM statistics (data not shown). Both richness and diversity of the archaeal community increased with depth particularly within the first centimeters (Fig. S.3). Intermediate and deeper layers supported a significant higher diversity of archaeal community than the surface layer (Fig. 2A and 2B). The huge dissimilarity (> 60 %, data not shown) between clusters suggests that deeper sediment layers exhibited archaeal populations clearly different from those of the sediment surface. The community composition was assessed by creating 16S rDNA clone libraries from sub-samplings performed at intervals 0-1 cm, 10-11 cm and 36-37 cm depths of the sediment core to confirm this observation and to identify archaeal taxa. A total of 199 clones were obtained and were grouped into different operational taxonomic units (OTU) according to their RFLP patterns. One representative clone of each OTU was sequenced and a total of 32 distinct archaeal sequences, according to a cut off value of 97 %, were subjected to phylogenetic analyses (Fig. 3, Table S.1). The number of clones analyzed represented 91 %, 64 % and 74 % coverage for clone libraries of the uppermost, intermediate and deep sediment layers, respectively. Sequences retrieved in this study were mainly affiliated to the two archaeal phyla, *Euryarchaeota* (~ 70 % of total sequences) and *Crenarchaeota* (~ 30 % of total sequences) (Table S.1), and one third of the sequences exhibited less than 95 % of similarity with sequences available in public databases. The methanogenic lineages of *Methanomicrobiales* and *Methanosaetaceae* and uncultured lineages Marine Benthic Group D (MBG-D, (Vetriani *et al.*, 1999)) and Miscellaneous Crenarchaeal Group (MCG, (Takai *et al.*, 2001)) accounted for 93 % of archaeal clone sequences. The novel family of *Methanoregulaceae* (Sakai *et al.*, in press) dominated among the *Methanomicrobiales*. Other lineages were detected but at low relative proportion: RC-V (Grosskopf *et al.*, 1998), the Val-III group (Jurgens *et al.*, 2000) and the Deep Sediment Euryarchaeotal Group (DSEG, (Takai *et al.*, 2001), Marine Benthic Groups A and B (MBG-A, MBG-B ; (Vetriani *et al.*, 1999), the Marine Group-I (MGI ; (DeLong, 1992)), and an unidentified lineage related to MCG (Fig. 3). It should be noticed that the affiliation of several



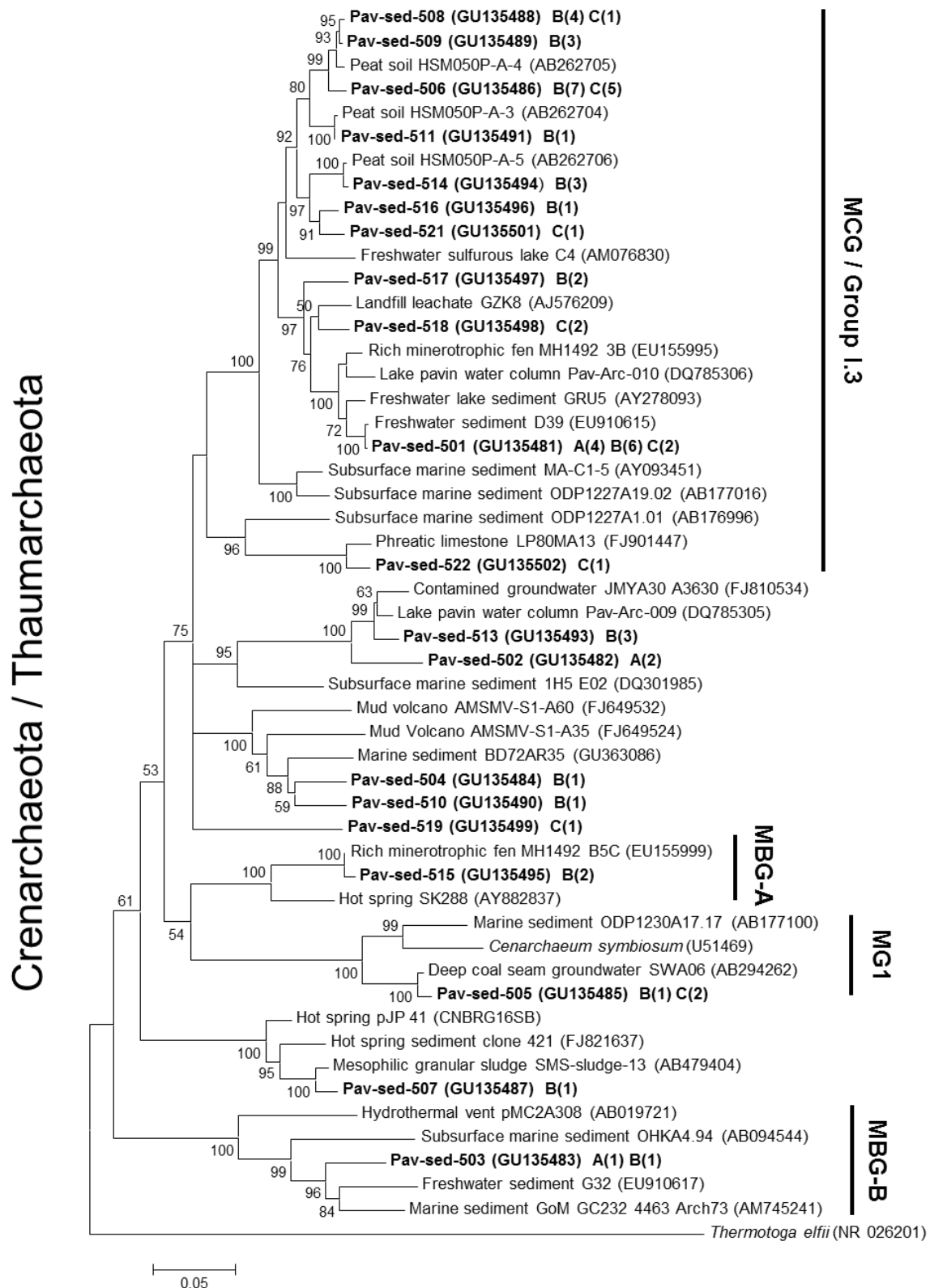


Figure 3: Phylogenetic analysis of the euryarchaeotal and crenarchaeotal/thaumarchaeotal 16S rRNA genes from sediments of Lake Pavin based on neighbour-joining method. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values $\geq 50\%$ bootstrap support. The number of sequences within each OTU is shown in parentheses, and the depth interval in which each clone was found is indicated by a letter: A, B, C for 0-1 cm, 10-11 cm and 36-37 cm depth intervals, respectively. The scale bars represent a 5% sequence difference, and *Thermotoga elfii* was used as an outgroup.

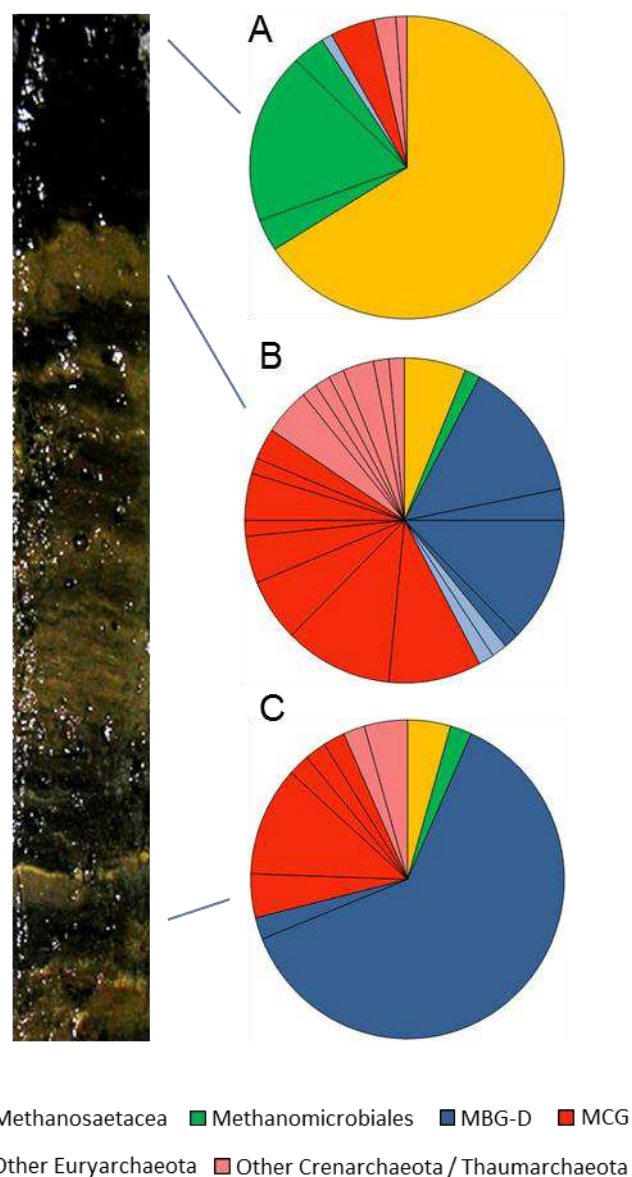


Figure 4: Frequency of the archaeal lineages in the clone libraries constructed at 0-1 cm depth (A), 10-11 cm depth (B), 36-37 cm depth (C) from the sediment of Lake Pavin. Segment in the circles correspond to OTUs grouping sequences with >97% similarity.

lineages detected in this study (MCG and MBG-B) within the “*Crenarchaeota*” is debated (Pester *et al.*, 2011) as they would also be assigned to the base of the archaeal phylum “*Thaumarchaeota*” (Brochier-Armanet *et al.*, 2008) or related to a more recently proposed archaeal phylum named “*Aigarchaeota*” (Nunoura *et al.*, 2011). Herein, they were referred as crenarchaeotal lineages. These lineages, and especially MCG, are phylogenetically diversified in Lake Pavin sediments, and might partially explained the high richness and diversity of the overall archaeal community in the intermediate and deep layers of the sediment compared to the surficial layer (Fig. 2A and 2B).

Large spatial archaeal community heterogeneity was noted with only 20 % similarity of archaeal 16S rDNA sequences between 0-1 cm depth and 36-37 cm depth (Fig. 4). The uppermost layer was dominated by methanogenic lineages (66 % of acetoclastic *Methanosaetaceae* and 25 % of hydrogenotrophic *Methanomicrobiales*), whereas in the deeper part of the sediment core, clone libraries were mainly composed of uncultivated archaeal lineages (62 % of MBG-D and 26 % of MCG). According to Bray-Curtis dissimilarity index, MBG-D and MCG lineages also exhibited different populations between samples of the intermediate and the deeper layers (33 % and 57 % of dissimilarity, respectively). Groupings of sediment depths with similar community structure, revealed by multivariate analysis of TTGE patterns, were then further supported by differences in phylogenetic composition.

16S rDNA and 16S rRNA quantification

The prokaryotic community in the Lake Pavin sediment was dominated by *Bacteria*, and *Archaea* accounted for only 3 to 12 % of the total prokaryotic 16Sr DNA copies number and 5 to 18 % of total prokaryotic cells (data not shown). No significant trend was noted for archaeal abundance according to depth (Fig. 2C and 5A). For cloning-independent quantification of the abundance of the different archaeal lineages detected in clone libraries, the 16S rDNA of the euryarchaeotal lineages *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales*, MBG-D and of the *Crenarchaeota* were quantified by qPCR. The acetotrophic (*Methanosaetaceae*) and hydrogenotrophic (*Methanomicrobiales*) methanogens dominated the archaeal community in the uppermost layer (4×10^7 and 1×10^7 copies g⁻¹ dry sediment at 0-1 cm depth, respectively) and decreased with depth (3.7×10^6 and 4.7×10^6 copies g⁻¹ dry sediment at 36-37 cm, respectively, Fig. 5B). Consistent with cloning and TTGE analyses, qPCR results showed a clear difference in archaeal community structure along the sediment core. The methanogenic euryarchaeotal cells were replaced by the MBG-D groups (2.6×10^7 copies g⁻¹ dry sediment at 36-37 cm depth) and the *Crenarchaeota* (1.2×10^7 copies g⁻¹ dry sediment

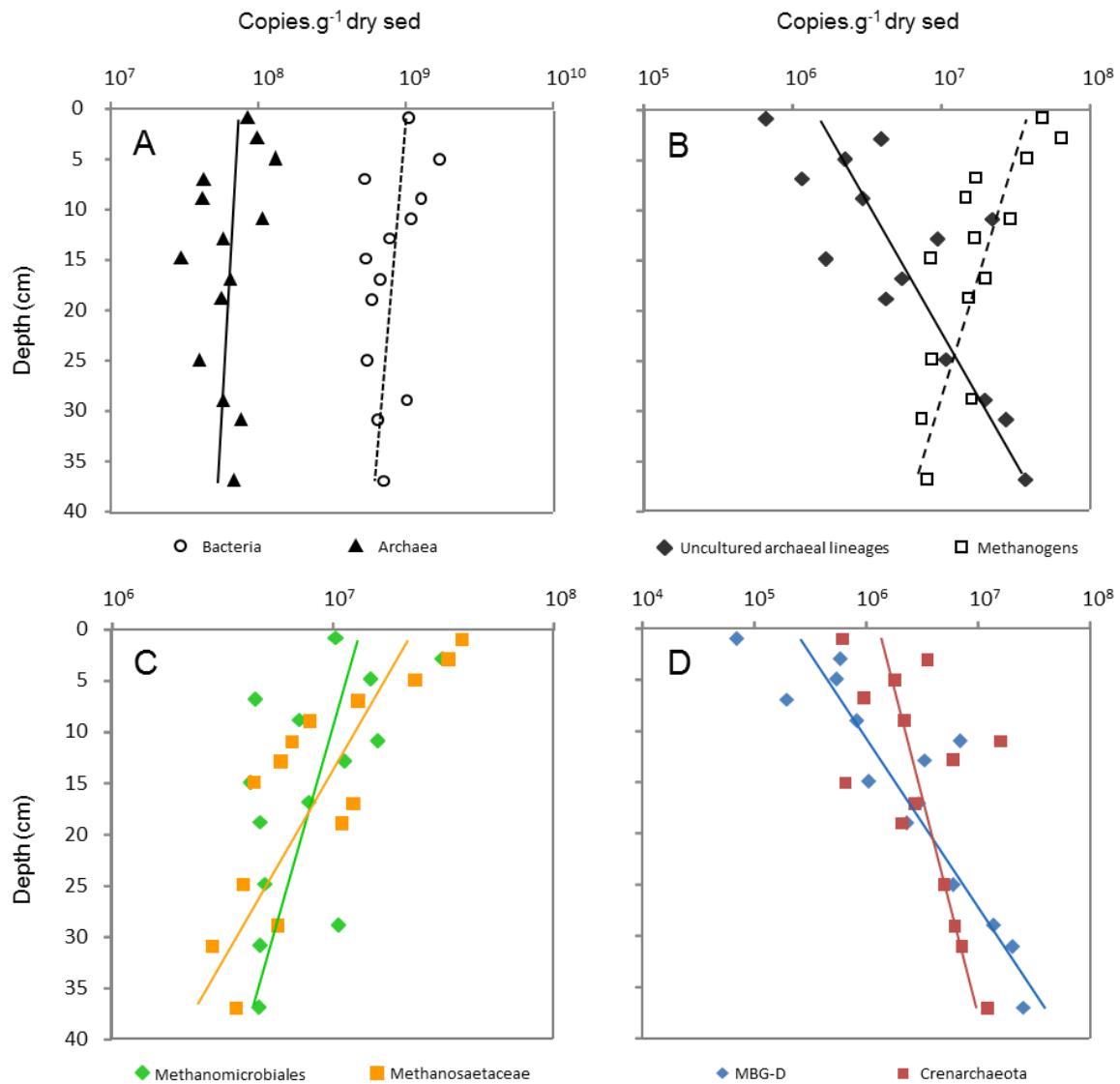


Figure. 5: Abundance of *Bacteria* and *Archaea* (A), methanogenic and uncultured archaeal lineages (B), *Methanomicrobiales* and *Methanosaetaceae* (C), and MBG-D and *Crenarchaeota* (D) within the fortieth first centimeters of Lake Pavin sediments. Lines are exponential regression lines. The abundance of methanogens and uncultured archaeal lineages were determined by the addition of *Methanomicrobiales* and *Methanosaetaceae*, and MBG-D and *Crenarchaeota*, respectively.

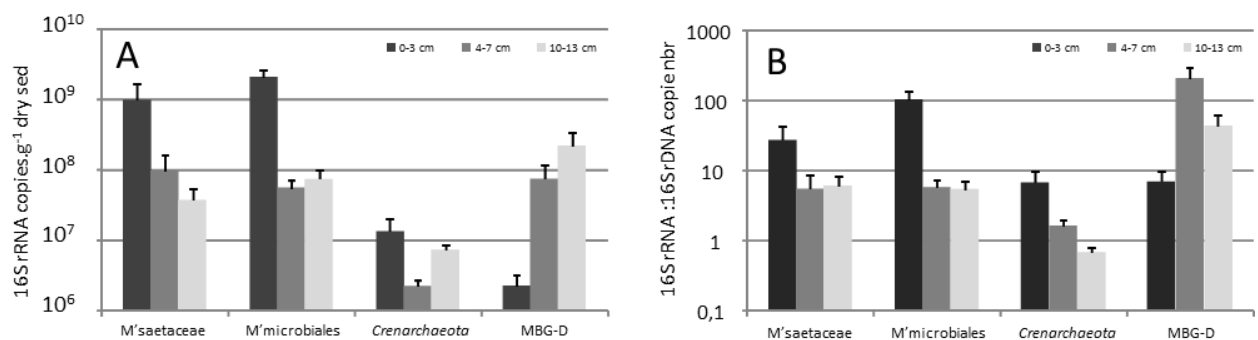


Figure 6 : Estimation of the activity of the main archaeal lineages by PCR quantification of the reverse transcribed 16S rRNA (A), and by the ratio 16S rRNA to 16S rDNA (B). M'saetaceae = *Methanosaetaceae*; M'microbiales = *Methanomicrobiales*.

at 36-37 cm depth, Fig. 5D). A strong correlation was noted between the abundances of these two lineages (Table 2). The abundance of *Methanosaetaceae* was positively correlated to the OM and OC content, and abundance of MBG-D was slightly negatively correlated to OM and OC content (Table 2, Fig. S.4). These abundances of these two lineages were also strongly negatively correlated. *Methanomicrobiales* and bacteria abundances are correlated.

As RNA content is generally correlated to cell activity (Rosset *et al.*, 1966; Nomura *et al.*, 1984; Kramer and Singleton, 1992; Kerkhof and Kemp, 1999) we quantified the 16S rRNA of dominant archaeal lineages (*Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales*, MBG-D lineages and *Crenarchaeota*) and compared it to their number of 16S rDNA in order to estimate how their activity changed with depth. At 0-3 cm, 4-7 cm and 10-13 cm depth of the sediment core (Fig. 6A). The trends were consistent with those of 16S rDNA quantification for *Methanosaetaceae*, *Methanomicrobiales* and MBG-D but not for *Crenarchaeota* (Fig 6A). The ratio of 16S rRNA to 16S rDNA copy number is consistent with those of the 16S rRNA quantification (Fig. 6B).

	Depth	Mst	MM	Cre	MBG-D	Arc	Bac
Depth		-0.781**	-0.5*	0.524*	0.866**	-	-0.46
OM	-	0.725**	-	-	-0.415	-	-
OC	-	0.621**	-	-	-0.426	-	-
Mst			-	-0.642	-0.835**	-	-
MM				-	-	0.626	0.802**
Cre					0.901**	-	-
MBG-D						-	-
Arc							0.621

Table 2 : Spearman's rank Correlation between the abundance of prokaryotic groups, depth, OM and OC. Only correlation < 0.05 were shown. * p value < 0.01. ** p value < 0.001. OM, Organic matter content, OC, Organic carbon content, Mst, *Methanosaetaceae*, MM, *Methanomicrobiales*, Cre, *Crenarchaeota*, Arc, *Archaea*, Bac, *Bacteria*.

Discussion

I. Archaea are a minority component of the prokaryotic community

Archaea are most likely the dominant microbial domain of the deep marine subsurface (Lipp *et al.*, 2008; Teske and Sorensen, 2008). In lake sediments, *Archaea* account from less than 1% (Schwarz *et al.*, 2007) to 99% (Ye *et al.*, 2009) of the prokaryotic community. According to available data, *Archaea* were found to be dominant in sediments of saline lakes [e.g. Lake Chaka (Jiang *et al.*, 2007), Lake Qinghai (Jiang *et al.*, 2008)] and to be a minority component of the prokaryotic community in freshwater sediments (Falz *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2007). Agreeing with these previous observations, our q-PCR analysis demonstrated that *Archaea* accounted for 5–18 % of the prokaryotic community throughout the 40 cm core of the freshwater sediments of Lake Pavin. Whereas few studies reported quantification of *Archaea* in lake sediments, discrepancies in the relative proportion of *Archaea* according to salinity might be explained, for a part, by Valentine hypotheses (Valentine, 2007). In this very interesting paper, the author postulated that “*adaptation to chronic energy stress is the primary factor differentiating archaeal and bacterial ecology*”. In mesophilic freshwater sediments, such as in Lake Pavin, the high degree of adaptability and metabolic diversification of *Bacteria* allow them to dominate *Archaea* in these environments where energy stress is not “chronic” compared to saline lakes.

II. Archaea exhibited a dichotomic distribution

Whereas, no significant vertical variations in the abundance of the overall *Archaea* were noted, important depth-related changes occurred in the composition and structure of the archaeal community. Such vertical changes in the structure of the archaeal community were previously reported from freshwater lake sediments according to fingerprint analyses (Koizumi *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2009), but without clear determination of how each archaeal lineages are affected by depth in the sediment. In our study, the gradual shift of archaeal community composition along the Pavin sediment core was approved by TTGE patterns, phylogenetic and quantification analyses.

Changes in archaeal community composition were accompanied by an increase in both richness and diversity between the upper and the deeper layers of the sediment. Compared to available data, the archaeal richness in Lake Pavin sediments (35 phylotypes in average) was high [e.g. Lake Hovsgol-14 phylotypes (Nam *et al.*, 2008); Lake Biwa-10 phylotypes (Koizumi *et al.*, 2004), Lake Taihu-19 phylotypes (Ye *et al.*, 2009)]. Deep sediment layers,

although with binding conditions, supported a diverse archaeal community. In undisturbed ecosystem like deep lake sediments, inactive cells may accumulate and persist during a long period after growth, depending on their resistance to starvation (Koizumi *et al.*, 2003a). Moreover, in this cold anoxic environments majority of DNA is extracellular and may be preserved for thousands of years (Danovaro *et al.*, 1999; Coolen and Overmann, 2007). However, two observations show that the high diversity of *Archaea* in the deep layers was not artefactual: (1) a clear dichotomy in the distribution of archaeal populations with methanogenic archaea progressively replaced by archaeal clades (putatively non-methanogenic) with unknown metabolisms (2) 16S rRNA quantification showed that targeted dominant communities were active.

All of these observations (diversity, composition, and activity patterns of archaeal communities along the sediment core) suggest that more ecological niches, clearly different from those in the upper sediment layer, are available for archaeal taxa in the deeper sediment. Notably, the clear inverse trend between methanogen abundance and uncultured archaeal lineages (putatively non-methanogenic) with depth (Fig. 5B) suggests they have contrasted ecological niches within the sediment. Further in the discussion, we will hypothesize about the putative functions of *Archaea* members in the anoxic sediments of Lake Pavin according to the literature and to the environmental factors available on these sediments.

III. Which archaeal groups occurred and what can they do?

Such as underlined above, methanogenic archaea were progressively replaced along the sediment core by archaeal clades with unknown metabolisms. This is a quite exciting as well as a frustrating observation to detect as many clades with unknown functions. Stratification of microbial community structure and composition is often observed in sedimentary systems. These spatial variations are generally explained by the sequential availability of electron acceptors and by changes in organic matter content (Nealson and Popa, 2005; Swan *et al.*, 2010). As no clear succession of inorganic electron acceptor occurs (Fig. S.1) and no correlation between organic matter availability and archaeal sub-group abundance (excepted for *Methanosaeta*) was noted, we formulated, for each dominant clade, a set of hypotheses to explain their distribution in Lake Pavin sediments.

III.1. Methanogenic archaea

According to our data, it is clear that the main archaeal community function in the superficial layer of the sediment of Lake Pavin monimolimnion is methane production.

Methanogens occurrence in the surface sediment layer is consistent with Lake Pavin meromicticity, as the reduction of the main inorganic electron acceptors (such as sulfate, ferric iron, nitrate...) occurs in the anoxic water column (Lopes *et al.*, 2011).

In this upper layer, methanogenesis is performed by two known methanogenic lineages: the acetotrophic *Methanosaetaceae* and the putatively hydrogenotrophic *Methanomicrobiales*. These lineages are frequently observed in superficial zone of freshwater sediments (Glissmann *et al.*, 2004; Koizumi *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2009) and the genera *Methanosaeta* and the family *Methanoregulaceae* dominate freshwater sediments (Borrel *et al.*, 2011). In freshwater aquatic systems methanogenesis accounts for 10 to 50 % of organic matter mineralization (Bastviken *et al.*, 2008) and according to the methane profile (7,7 mM of CH₄ in average), it is an important terminal mineralization pathway in this ecosystem.

In lake Pavin sediments, the *Methanosaetaceae* dominated over *Methanomicrobiales* (60 % - 25 %) in the three clone libraries as observed in the Pavin anoxic water column (Lehours *et al.*, 2007), suggesting that acetotrophic methanogenesis is an important mineralization pathway and the main source of methane in this ecosystem. That is a quite surprising observation if we consider that acetate oxidation is the less thermodynamically favorable pathway for methanogenesis (Garcia *et al.*, 2000). We formulate two hypotheses to explain this observation:

- (1) Acetate is a non-competitive substrate in this ecosystem such as previously suggested (Lehours *et al.*, 2009).
- (2) *In situ* conditions (acidic pH values and low temperature) of Pavin sediments favor acetogenesis over hydrogenotrophic methanogenesis (Phelps and Zeikus, 1985; Schulz and Conrad, 1996; Nozhevnikova *et al.*, 2007).

The abundance of *Methanosaetaceae* was significantly correlated with both OM and OC content along the sediment core (Table 2). In contrast with the abundance of *Methanosaetaceae*, the content in OM and OC did not decrease significantly with depth. This suggests that another factor, probably the organic matter lability to biodegradation, is responsible of the decrease in the abundance of *Methanosaetaceae*. This hypothesis is sustained by the decrease of the 16S rRNA to 16S rDNA ratio (Fig. 6B). *Methanosaeta* members are only able to grow on acetate, and considering that the organic matter reactivity decreases with sediment age and depth (Middelburg *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2005; Burdige, 2007), and that dissolved labile compounds only diffuse on a limited surface layer (Schulz and Conrad, 1995; Schwarz *et al.*, 2008), cells detected in the deepest layers are probably not

growing but rather surviving. We also noted that the abundance of *Methanomicrobiales* decreased less significantly than that of *Methanosaetaceae* community. Chan *et al.*, (2005) reported a similar observation in Lake Dagow and hypothesized that this differential response to the increasing depth may be due to a differential death (starvation) rather than a differential growth between *Methanomicrobiales* and *Methanosarcinales*. On the other hand, the strong correlation between *Methanomicrobiales* and bacterial abundances suggest that a syntrophic association with bacteria is the main driver of *Methanomicrobiales* abundances.

Another surprising observation is that CH₄ was detected at high concentrations in the deep layer of the sediment core whereas its concentrations decreased in the intermediate layer. Methane profile suggest that other archaeal groups than known methanogenic lineages might be involved in CH₄ cycle, this hypothesis will be discussed below.

III.2. Uncultured archaeal clades

Uncultured archaeal lineages are ubiquitous in freshwater sediments (Auguet *et al.*, 2010; Barberán *et al.*, 2011) suggesting that they are adapted to this environment and might play key functional roles. In Lake Pavin, the relative proportion and abundances of euryarchaeotal MBG-D and crenarchaeotal MCG groups increased with depth and these lineages dominated the archaeal community in the intermediate and deeper layers of the sediment. The observation was also reported, for MBG-D, according to clone libraries from marine (Vetriani *et al.*, 1999; Roussel *et al.*, 2009), freshwater (Schubert *et al.*, 2011), hypersaline (Swan *et al.*, 2010) sediments, and from a peatland (Cadillo-Quiroz *et al.*, 2006). According to their environmental distribution, mainly in sub-surfaces, these archaeal lineages are probably able to use intriguing catabolic pathways and have probably special physiological adaptations allowing them to thrive with the low energetic flux available in buried sediment layers. One physiological adaptation proposed by Valentine (2007) to account for the ability to thrive in these environments is the low permeability of the archaeal membrane which reduces the energy loss at the cellular level and thereby the minimum intake flux of energy necessary to maintain cellular integrity and activity. This low permeability is also an advantage in hypersaline environments (Valentine, 2007) and might explain the abundance of MBG-D in hypersaline lake sediments where they can dominate over bacteria (Jiang *et al.*, 2008; Swan *et al.*, 2010). But, this adaptation probably reduces the competitiveness of these Archaea in dynamic and energetic environments because they are less

Authors	Lake sediments	Uncultured euryarchaeotal lineages						Crenarchaeotal / Thaumarchaeotal lineages			
		RC-V	MBG-D	LDS	TMEG	RC-II	Others	MCG	MGI	MBG-B	Others
MacGregor <i>et al.</i> , 1997	Michigan	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
Falz <i>et al.</i> , 1999	Rotsee	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-
Nusslein 2001	Kinneret	-	x	-	?	-	-	-	-	-	-
Chan <i>et al.</i> , 2002	Grosse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Purdy <i>et al.</i> , 2003	Heywood	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Koizumi <i>et al.</i> , 2004	Biwa	x	-	?	-	-	-	-	x	-	-
Earl <i>et al.</i> , 2005	Priest pot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chan <i>et al.</i> , 2005	Dagow	x	x	x	x	-	unclassif	-	-	-	-
Schwarz <i>et al.</i> , 2007	Kinneret	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Conrad <i>et al.</i> , 2007	Stechlin	x	x	x	-	-	-	x	-	-	-
Ye <i>et al.</i> , 2009	Taihu	x	x	x	x	-	SM-I	-	-	-	MCG related
Conrad <i>et al.</i> , 2010	Mussara	-	x	x	-	x	-	x	-	-	unclassif
	Batata	x	x	x	-	x	-	x	-	-	unclassif
Haller <i>et al.</i> , 2011	Geneva	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-
Schubert <i>et al.</i> , 2011	Cadagno	-	x	-	x	-	AAA	-	-	x	MBG-C
This study	Pavin	x	x	-	-	-	DSEG, Val-III	x	x	x	MBG-A

Table S.2: Distribution of the main uncultured euryarchaeotal and crenarchaeotal/thaumarchaeotal lineages in freshwater lake sediments based on 16S rRNA gene. The affiliation was based on published trees and new construction of trees with archaeal sequences from lake sediments retrieved from NCBI. "x" : detected; "-" : undetected; "?" ambiguous affiliation. RC-V, Rice Cluster V; MBG-D, Marine Benthic Group D; LDS, Lake Dagow Sediments; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; RC-II, Rice Cluster II; SM-I, Sippenauer Moor I, AAA, AOM-associated Archaea; DSEG, Deep Sediment Euryarchaeotal Group; Val-III, from Valkea; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group; MGI, Marine Group I; MBG-C, B, A, Marine Benthic Group C, B, A.

abundant in surface sediment layer where labile organic matter is seasonally delivered to the sediment by dead algal deposition.

III.2.a. MBG-D

Sequences belonging to the euryarchaeotal MBG-D, a *Thermoplasmatales*-related group, were found in a variety of freshwater and marine habitats (Munson *et al.*, 1997; Galand *et al.*, 2003; Coolen *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2011). Along with the Rice cluster V (RC-V) and Lake Dagow Sediments (LDS) lineages, the MBG-D are the most widely encountered uncultured lineages in freshwater lake sediments (Table S.2). Although the metabolism of MBG-D representatives remains unknown, several hypotheses can be postulated according to their environmental repartition and their phylogenetic affiliation. The high CH₄ concentration in the deeper layer might be consistent with a methanogenic activity of MBG-D, however this group was previously identified as non-methanogenic (Jiang *et al.*, 2008). Members of the MBG-D represented the unique archaeal members in clone library from the bottom of the AOM zone of the Lake Cadagno (Schubert *et al.*, 2011) and were detected in several other marine environments and cultures where AOM occurs (Inagaki *et al.*, 2006; Harrison *et al.*, 2009; Webster *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). These observations coupled with that of Beal *et al.*, (2009) who noted that MBG-D clones represented up to 40 % of archaea in clone library of their AOM enrichments from methane-seep sediment might imply the involvement of MBG-D members in AOM. This hypothesis is consistent with the high activities of this group detected in the intermediate layer (Fig. 6) where CH₄ concentrations decreased (Fig. S.1) and with the high concentration of particulate iron (2-25%) in the sediment (Schettler *et al.*, 2007). However MBG-D also represent a high fraction of the prokaryotic community in hypersaline sediments where methane concentrations are extremely low (Jiang *et al.*, 2008; Swan *et al.*, 2010), suggesting that some MBG-D members are not involved in AOM processes but instead, would benefit of waste-products, intermediates or dead cells produced in sedimentary environments. As proposed for members of two lineages related to MBG-D, the *Thermoplasmatales* (Seegerer *et al.*, 1988) and RC-III (Kemnitz *et al.*, 2005) (a sister group of MBG-D), representatives of MBG-D might be scavengers in their environment and may need components from decaying microorganisms (such as oligopeptides (Smith *et al.*, 1975)) as carbon and/or energetic source for growth. For example, the decay of methanogenic microorganisms with depth might provide building elements for some representatives of uncultured archaeal lineages (as isoprenoids moieties of lipids) that may minimizing their energy expenditure for growth and maintenance (Takano *et al.*, 2010).

III.2.b. MCG

MCG are considered cosmopolitan but they are frequently retrieved in anoxic habitats (Biddle *et al.*, 2006). MCG archaeon have been considered as heterotrophic anaerobes based on their capability to take up organic carbon in buried sediments (Biddle *et al.*, 2006). However, their huge cosmopolitan distribution in a wide range of biogeochemically distinct sedimentary settings (Biddle *et al.*, 2006) and their complex phylogeny suggest a metabolic diversity and an ecophysiological flexibility larger than assumed previously. Current evidence suggest that some members of the MCG lineage may obtain energy from the anaerobic oxidation of methane but use a “dissimilatory” methane-oxidizing process and do not assimilate its carbon (Biddle *et al.*, 2006). This hypothesis fits with the decrease of methane concentrations in the intermediate layers of the sediment core of Lake Pavin where MCG dominated the archaeal community.

Concluding remarks

This study revealed that important archaeal structure changes occurred in the sediment of Lake Pavin along the 40 cm sediment core. The opposite trends between methanogens and uncultured lineage abundances may be explained by differing or opposite optimum growth conditions. It could also be hypothesized that the decay of methanogenic microorganisms with depth furnishes building elements for some representatives of uncultured archaeal lineages (as isoprenoids moieties of lipids) that may reduce their energy expenditure for growth and maintenance (Takano *et al.*, 2010). One of this uncultured archaeal group, the MBG-D, is generally associated with marine and hypersaline environments, however, its high abundance in Lake Pavin sediments and its common occurrence in freshwater lakes sediments (Table S.2) demonstrate that it can be an important group in sedimentary environments regardless of the salinity. The common association of MBG-D with communities performing AOM, in number of environment and/or culture enrichments, presents the intriguing hypothesis that AOM also occurs in Lake Pavin sediments, though this needs further study. The new primers design herein and the probes recently designed (Schubert *et al.*, 2011) would be helpful to clarify the role MBG-D plays in this significant ecological process.

OTU name	Accession number	Number of clones			Phylogenetic affiliation	
		0 -1 cm	10 - 11 cm	36 - 37 cm		
Pav-sed-101	GU135459	58	4	2	Methanosaeta	Methanosarcinales
Pav-sed-202	GU135463	3			Methanospirillaceae	Methanomicrobiales
Pav-sed-201	GU135462	16	1		Methanoregulaceae	
Pav-sed-204	GU135465	3				
Pav-sed-207	GU135467			1		
Pav-sed-301	GU135468	1			RCV	
Pav-sed-302	GU135469		1		DSEG	
Pav-sed-304	GU135471		1		Val-III	
Pav-sed-401	GU135475		9	28	Thermoplasmatales-related	MBG-D
Pav-sed-402	GU135476		2			
Pav-sed-403	GU135477		8	1		
Pav-sed-404	GU135478		1			
Pav-sed-501	GU135481	4	6	2	MCG	Crenarchaeota
Pav-sed-506	GU135486		7	5		
Pav-sed-508	GU135488		4	1		
Pav-sed-509	GU135489		3			
Pav-sed-511	GU135491		1			
Pav-sed-514	GU135494		3			
Pav-sed-516	GU135496		1			
Pav-sed-517	GU135497		2			
Pav-sed-518	GU135498			2		
Pav-sed-521	GU135501			1		
Pav-sed-522	GU135502			1		
Pav-sed-502	GU135482	2			unidentified Crenarchaeota	
Pav-sed-513	GU135493		3			
Pav-sed-504	GU135484		1			
Pav-sed-510	GU135490		1			
Pav-sed-507	GU135487		1			
Pav-sed-519	GU135499			1		
Pav-sed-515	GU135495		2		MBGA	
Pav-sed-503	GU135483	1	1		MBGB / DSAG	
Pav-sed-505	GU135485		1	2	MG-I	Thaumarchaeota

Table S.1: Affiliation of the archaeal 16S rRNA genes sequences for the for the 3 investigated depths and number of clone of each OTU. MBG-D, Marine Benthic Group D; RC-V, Rice Cluster V; DSEG, Deep Sediment Euryarchaeotal Group; Val-III, from Valkea; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group; MGI, Marine Group I; MBG-B, -A, Marine Benthic Group B, A.

Acknowledgment

We thank Jonathan Colombet and Lionel Jouve for their help during sampling fields. We are also grateful for the useful advices of Marion Sabart for the qPCR, and Isabelle Batisson for the TTGE. We greatly thank Kevin Purdy for his invitation at the Department of Biological Sciences of University of Warwick and Franck Carbonero for his careful teaching of RNA extractions from sediment.

Figure S.3: Vertical changes in number of archaeal phylotypes (richness, R) and diversity (Shannon diversity index, H') along the first 37 cm of sediment. The number of phylotypes corresponds to the number of band on the TTGE gel. The diversity was calculated on the basis of the number of band and their relative intensity.

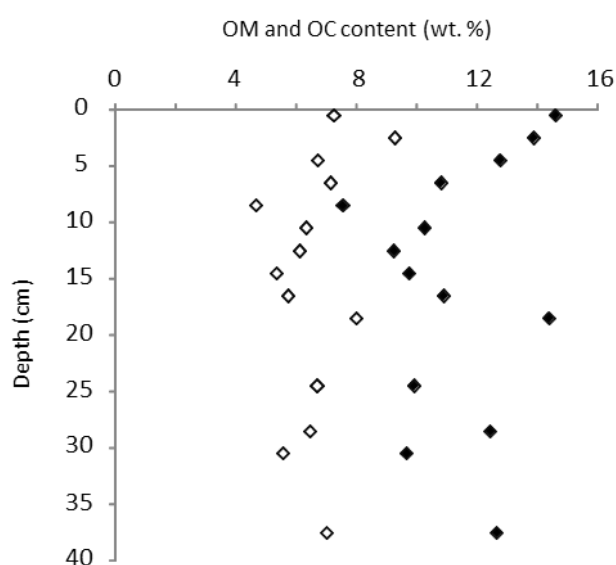
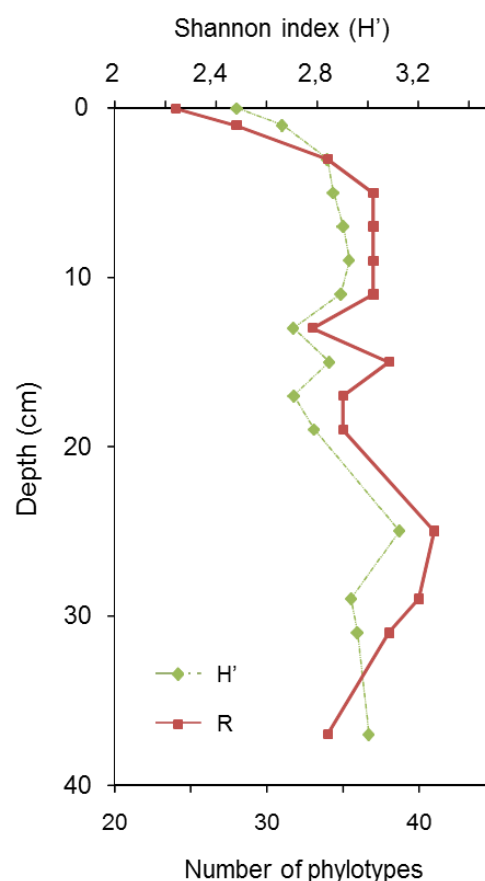


Figure S.4: Organic matter (OM) and organic carbon (OC) content in the fortieth first centimeters of Lake Pavin sediments. Filled diamond, OM; open diamond, OC.

Etude 3: *Methanobacterium lacus* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the deep cold sediment of a meromictic lake.

Guillaume Borrel^{1,2,*}, Keith Joblin^{1,2}, Annie Guedon^{1,2}, Jonathan Colombet^{1,2}, Vincent Tardy^{1,2}, Anne-Catherine Lehours^{1,2} and Gérard Fonty^{1,2}.

¹ Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, BP 10448, F63000, Clermont-Ferrand.

² UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France.

*Correspondence: Guillaume Borrel, guillaume.borrel@univ-bpclermont.fr

Abstract

An autotrophic, hydrogenotrophic, methanogenic isolate 17A1^T was purified from the sediment of a meromictic lake (Lake Pavin) in France. The cells of isolate 17A1^T were non-motile Gram-negative rods, 2 – 15 µm long by 0.2 – 0.4 µm wide, which grew as filaments. Isolate 17A1^T grew in a mineral medium and its growth was stimulated by yeast extract, vitamins, acetate or rumen fluid. Penicillin, vancomycin and kanamycin reduced but did not completely inhibit growth. Optimal growth occurred at 30 °C (range 14 – 41°C), pH 6.5 (range 5.0 – 8.5), 0.1 M NaCl (range 0 – 0.4 M). The isolate utilised H₂/CO₂ and methanol/H₂ as substrates but not formate, acetate, methylamine/H₂, isobutanol or isopropanol. The DNA G+C content is 37.0 mol%. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence placed the isolate in the genus *Methanobacterium* and showed that the most similar cultivated methanogen was *Methanobacterium beijingense* with a sequence similarity of 96.3 %. Based on phenotypic and phylogenetic parameters, isolate 17A1^T represents a novel methanogen species and the name *Methanobacterium lacus* sp. nov. is proposed (= DSM 24406^T = JCM 17760^T).

The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain 17A1^T is HQ110085.

A significant proportion (6-16%) of the global natural emissions of methane are produced from freshwater lakes (Bastviken *et al.*, 2004) and it appears that a large part of this is from hydrogenotrophic methanogens (Conrad, 1999). To date, few methanogens have been isolated from freshwater lake sediments and characterised. These include *Methanomethylovorans hollandica* which degrades dimethyl sulphide and methane thiol (Lomans *et al.*, 1999) and *Methanosarcina lacustris* which can produce methane from methanol, methylamine and H_2/CO_2 (Simankova *et al.*, 2001). Lake Pavin in France is a natural deep (92 m) freshwater lake which is unusual because the water column has been stratified for a very long period without mixing (Michard *et al.*, 1994). The sediment is covered by a 30 m, cold (5°C) anoxic water column which is in a steady state (Assayag *et al.*, 2008). A molecular ecology study of methanogens in the water column (Lehours *et al.*, 2007) revealed that the methanogenic community consisted mainly of *Methanosaeta* spp. (acetoclastic) and species belonging to the *Methanomicrobiales* (putative hydrogenotrophs). During a study on methanogens in the sediment of Lake Pavin, we obtained enrichments containing *Methanosarcina* spp. and *Methanosphaerula* spp. and purified several hydrogenotrophic isolates. We describe here one of the hydrogenotrophic methanogens, isolate 17A1^T.

Sediment samples were collected in December 2007 with a gravity-core sampler and transported under anaerobic condition at 4°C in the dark. Immediately after return to the laboratory, 1 g of sediment was used to inoculate medium Mc (5 ml) under an O_2 -free N_2 headspace in Hungate tubes. This medium, also used for isolation and maintenance of isolate 17A1^T, contained per liter: 0.15 g $(NH_4)_2SO_4$; 0.4 g KH_2PO_4 ; 0.6 g K_2HPO_4 ; 0.05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.024 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.20 g NaCl; 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.2 g yeast extract; 0.001 g resazurin; 2.0 g $NaHCO_3$; 0.5 g cysteine-HCl; vitamin solution (5 ml) and trace elements solution (10 ml). The vitamin solution contained per liter: 2.0 mg biotin; 2.0 mg folic acid; 10.0 mg pyridoxine-HCl; 5.0 mg Thiamine-HCl $2H_2O$; 5.0 mg riboflavin; 5.0 mg nicotinic acid; 5.0 mg D-Ca-pantothenate; 0.10 mg vitamin B_{12} ; 5.0 mg p-aminobenzoic acid; 5.0 mg lipoic acid, and the trace element solution contained per liter: 1.50 g nitrilotriacetic acid; 3.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.50 g $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1.0 g NaCl; 0.10 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.18 g $CoSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.10 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.18 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.02 g $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$; 0.01 g H_3BO_3 ; 0.01 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 0.03 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.30 mg $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$. The pH of the medium was adjusted to 6.8 and then the medium was boiled and cooled under O_2 -free N_2/CO_2 (80:20) transferred to Hungate tubes under an O_2 -free N_2/CO_2 (80:20) atmosphere.

After inoculation, the headspace was pressurized to 2 atm with O₂-free H₂/CO₂ (80:20) and cultures incubated without shaking in the dark at room temperature (~ 22 °C). After 4 weeks, cultures were examined for methane production and the presence of cells fluorescing at 420 nm (Mink and Dugan, 1977). Inocula from methane-positive cultures were serially diluted in fresh Mc medium containing vancomycin (0.2 g. L⁻¹) and incubated under O₂-free H₂/CO₂ as before. Methanogen isolates were obtained by colony selection from medium Mc agar roll tubes (Hungate, 1969) inoculated with the most dilute methane-positive cultures. The dilution and colony selection process was repeated twice to yield a pure culture of isolate 17A1^T. Cells fluoresced when examined at λ_{340} or λ_{420} . Only one cell type was observed under phase contrast microscopy and epifluorescence microscopy. There was no growth of contaminating eubacteria when medium Mc supplemented with glucose (5 mM), maltose (5 mM), cellobiose (5 mM), starch (5 mM) and yeast extract (0,5%) was inoculated with isolate 17A1^T.

Growth was measured by turbidimetry (absorbance at 535 nm) and methane was measured by gas chromatography. The temperature dependence of growth was determined from incubations at 7, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 37, 41 and 46°C and the pH dependence was determined in medium Mc pre-equilibrated to pH values of 4.6, 5, 5.7, 6.5, 7.1, 7.5, 7.9, 8.2, 8.6, 9 and 9.5 by addition of mixtures of sodium acetate, acid acetic, NaHCO₃, Na₂CO₃, HCl and NaOH. The pH levels measured before inoculation and 1, 2, 3 and 4 days after inoculation did not change by more than 0.2. The effect of salinity on growth was measured in Mc medium containing 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7 and 1M NaCl. Cells for scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were prepared by the methods described in Lehours *et al.* (2010) and Chavant *et al.* (2005) respectively. The DNA G+C content was determined by the identification service of the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany), by using HPLC (Tamaoka and Komagata, 1984; Mesbah *et al.*, 1989).

For the phylogenetic analysis, the 16S rRNA gene was amplified by PCR using the method described in Skillman *et al.* (2004), and the primers 21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') (DeLong, 1992) and 1386r (5'-GCGGTGTGTGCAAGGAGC-3') (Skillman *et al.*, 2004). PCR products were cloned and send to MWG Biotech (Germany) for sequencing. 16S rDNA sequences were assessed with BLASTn (Altschul *et al.*, 1990), imported into MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>)

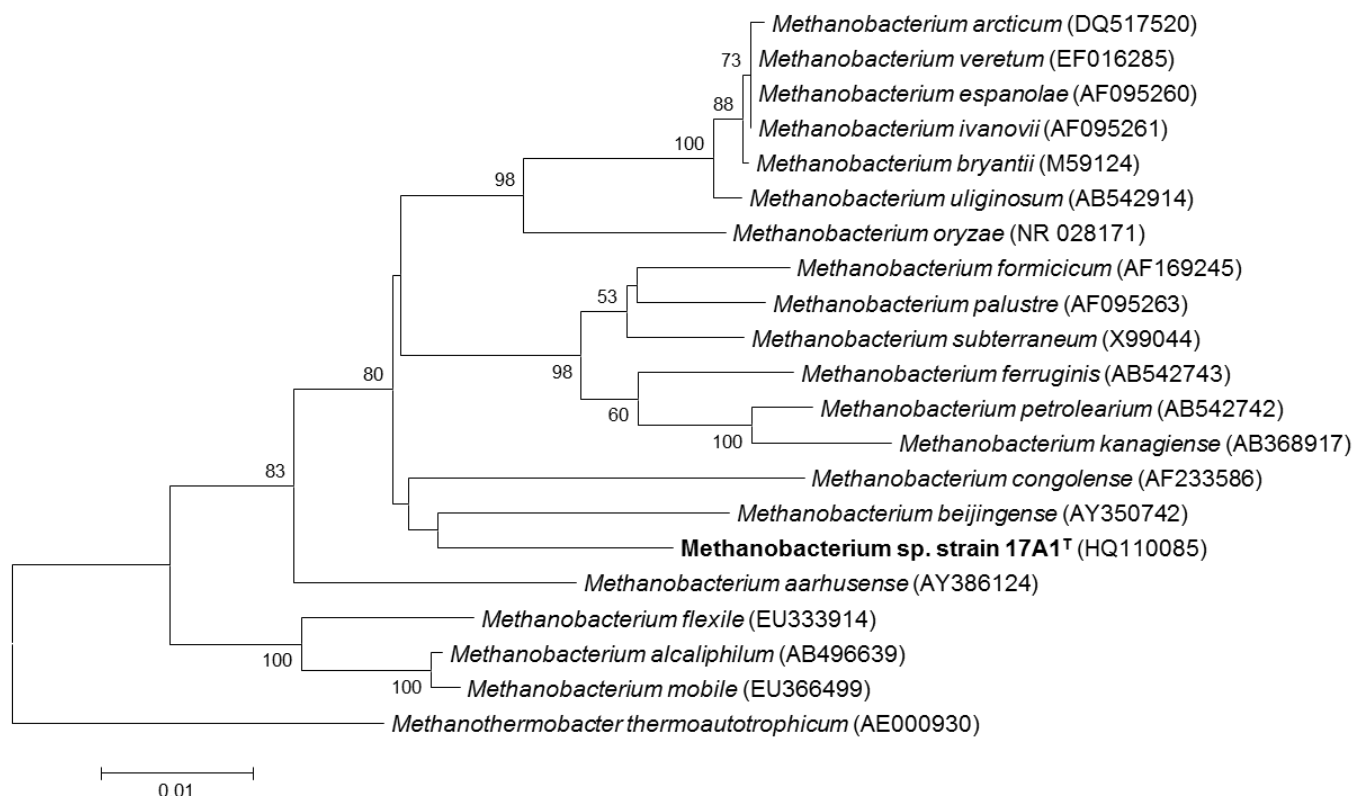


Figure 1: Neighbour-joining dendrogram showing the phylogenetic relationships between isolate 17A1^T and species of methanogens. Bootstrap values (>50%) shown on branches were calculated from 1,000 resamplings. The accession numbers of 17A1^T and reference sequences are given in parentheses. The scale bar represents 0.005 substitutions per base position.

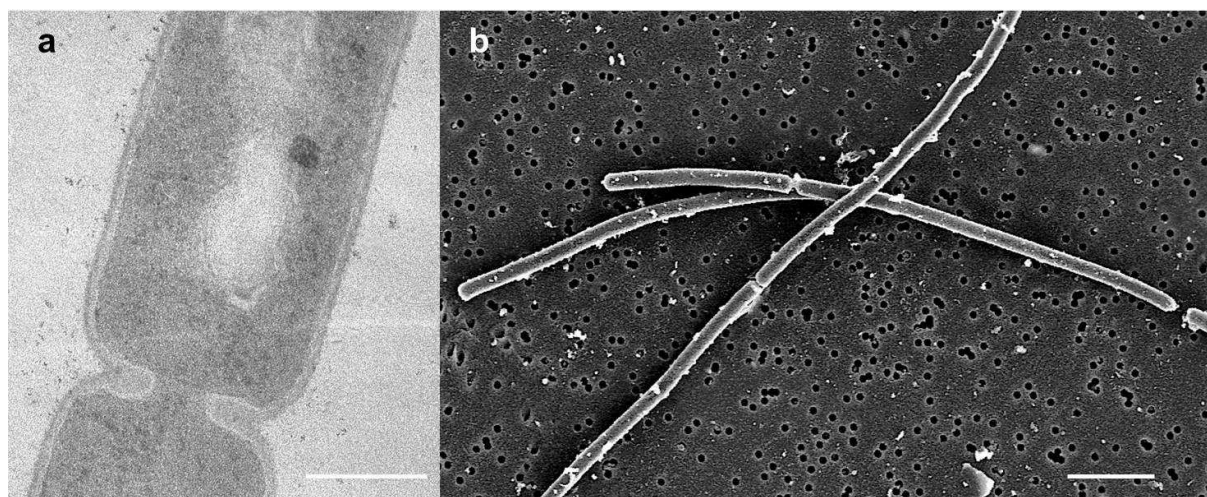


Figure 2: Electron micrographs of isolate 17A1^T. (a) Transmission electron micrograph of an ultrathin section, bar, 200 nm; (b) scanning electron micrograph, bar, 2 μ m.

(Kitamura *et al.*, 2010) and aligned in CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Alignments were manually checked and the phylogenetic position of isolate 17A1^T established from a dendrogram generated using the neighbour-joining program in MEGA4. The robustness of the tree was evaluated from 1000 resamplings.

The phylogenetic analysis showed that isolate 17A1^T clustered with methanogens belonging to the genus *Methanobacterium* (Fig. 1). The 16S rRNA gene (1351 bp) was found to have a high sequence similarity (> 97%) with clone sequences obtained from the sediments of the dystrophic Lake Grosse Fuchskuhle (Chan *et al.*, 2002) and the meromictic Lake Kinneret (Nüsslein *et al.*, 2001). These have GenBank accession numbers AF481340 and AJ310872 respectively. The most closely related cultivated species is *Methanobacterium beijingense* (Ma *et al.*, 2005) which has a 16S rRNA gene sequence 96.3% identical to that of isolate 17A1^T. Because its 16S rRNA gene sequence has less than 97% similarity with sequences of known *Methanobacterium* spp., isolate 17A1^T represents a new species (Stackebrandt and Goebel, 1994). The 16S rRNA gene sequence of isolate 17A1^T has been deposited in GenBank with accession number HQ110085.

At present, the genus *Methanobacterium* consists of 19 validated species (Shlimon *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2005; Bonin and Boone, 2006; Kitamura *et al.*, 2010; Krivushin *et al.*, 2010; Mori and Harayama, 2011; Shcherbakova *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2011). These usually grow by reducing CO₂ with H₂. The phenotypic characteristics of isolate 17A1^T grown in medium Mc under H₂/CO₂ were consistent with those expected and are given in Table 1 together with those of the type strains of *Methanobacterium* species which might be mistaken for isolate 17A1^T. Cells were Gram-negative non-motile rods 0.2 - 0.4 µm wide and with lengths ranging between 2 and 15 µm. The rods had rounded ends and varied in shape from straight to slightly curved during exponential growth to a bent shape in stationary phase. Cells grew as filaments (Fig. 2) and under UV light (λ₄₂₀) exhibited fluorescence typical of methanogens (not shown). Cells from an exponentially growing culture were resistant to lysis when they were transferred in distilled water (as hypotonic solution) and 1% SDS. On agar under H₂/CO₂, isolate 17A1^T grew as small (diameter of around 1 mm) round greyish-white colonies with entire edges (not shown).

Table 1: Phenotypic characteristics of isolate 17A1^T and of type strains of five *Methanobacterium* species.

		Isolate 17A1 ^T	<i>M. beijingense</i> ¹	<i>M. veterum</i> ²	<i>M. formicicum</i> ³	<i>M. palustre</i> ⁴	<i>M. espanolae</i> ⁵
Cell Morphology (Rods)							
Length (µm)		2 - 15	3 - 5	2 - 8	2 - 15	2.5 - 5	3 - 22
Width (µm)		0.2 - 0.4	0.4 - 0.5	0.4	0.4 - 0.8	0.5	
Gram stain		-	-	-	+	+	+
Catabolic substrates							
Formate		-	+	-	+	+	-
2-propanol + CO ₂		-	-	-	-	+	-
Methanol (50mM) + H ₂		+	nd	+	nd	nd	nd
Methylamine (20mM) + H ₂		-	nd	+	nd	nd	nd
Growth requirements							
Chemoautotrophic		+	-	+	-	+	+
Yeast extract		s	e	nr	nd	nd	s
Vitamin		s	nr	nr	nd	nd	s
Acetate		s	s	s	s	nd	nr
Growth ranges and optima							
Temperature (°C)	Range	14 - 41	25 - 50	10 - 46	nd	nd	20 - 40
	Optimum	30	37	28	37 - 45	37	35
pH	Range	5 - 8.5	6.5 - 8.6	5.2 - 9.4	nd	nd	4.7 - 7
	Optimum	6.5	7.2 - 7.7	7.2 - 7.4	6.6 - 7.8	7	5.6 - 6.2
Salinity	Range	0 - 0.4	0 - 0.5	0 - 0.3	nd	0 - 0.3	nd
	Optimum	0.1	nd	0.03	nd	0.2	nd
G+C content (mol. %) *		37.0 (Lc)	38.9 (Tm)	33.8 (Tm)	41-42 (Bd)	34 (Tm)	34 (Tm)

-, negative; +, positive; nd, not determined; e, essential; nr, not required; s, stimulatory.

* Determined by buoyant density analysis (Bd), HPLC analysis (Lc) or melting point analysis (Tm).

All the type strains listed form filaments and utilize H₂/CO₂ as catabolic substrate

¹Ma *et al.* 2005; ²Krivushin *et al.* 2009; ³Bryant and Boone, 1987; ⁴Zellner *et al.*, 1989; ⁵Patel *et al.*, 1990.

Isolate 17A1T grew as a chemoautotroph in a modified medium Mc without vitamins and yeast extract. Growth was stimulated by the addition of acetate (5 mM), vitamins (5 ml L⁻¹), yeast extract (0.2 g L⁻¹) or rumen fluid (5 ml.L⁻¹) (data not shown). Isolate 17A1^T utilised H₂/CO₂, and methanol + H₂ for growth (Table 1) and methane production, but did not grow on methanol(30 mM), methylamine (20 mM) + H₂, formate (30 mM), acetate (30 mM), 2-propanol (20 mM) or isobutanol (20 mM). This catabolite substrate profile is similar to that of *M. veterum* (Krivushin *et al.*, 2010) with the exception that *Methanobacterium veterum* was able to grow on methylamine + H₂ (Table 1). The isolate grew on H₂/CO₂ at temperatures between 14 and 40 °C with optimal growth at 30°C. This is the second lowest temperature optimum for species of *Methanobacterium*, the lowest being 28°C for *M. veterum* (Krivushin *et al.*, 2010). Isolate 17A1^T grew in medium Mc at pH values between pH 5 and 8.6 with optimal growth at pH 6.5 (data not shown). This is significantly lower than the pH growth optima of *M. beijingense* (Ma *et al.*, 2005) and *M. veterum* (Krivushin *et al.*, 2010). Although the isolate grew in medium Mc without NaCl, growth was optimal when the medium contained 0.1 M NaCl. There was no growth when the NaCl concentration was greater than 0.4 M. The doubling time of isolate 17A1^T in medium Mc with 0.1 M of NaCl and pH 6.8, at 25°C, was 22 h. Penicillin (0.01%), vancomycin (0.01 %) and kanamycin (0.001 %) decreased growth by 49 %, 27 %, and 17 %, respectively. At concentrations of 0.1%, penicillin and vancomycin decreased growth by 87% and 63% respectively.

On the basis its morphological, physiological and phylogenetic characteristics, we propose that isolate 17A1^T is a novel species of the *Methanobacterium* genus, and we proposed the name *Methanobacterium lacus*.

Description of *Methanobacterium lacus* sp. nov.

Methanobacterium lacus (la'cus. L. gen. n. *lacus* of a lake, indicating the site of isolation).

Cells are non-motile long (2-15 µm) rods growing usually as filaments. Cells stain Gram-negative, autofluoresce under UV light (λ₄₂₀) and are resistant to lysis in 0.1% SDS and hypotonic solution (distilled water). Surface colonies on agar are small, round and greyish-white with entire edges. Cells are obligately anaerobic and grow as chemoautotrophs. The temperature range for growth is 14 - 40°C with an optimum at 30°C. The pH range for growth is 5.0 - 8.6 with an optimum of pH 6.5. Optimal growth occurs in the presence of 0.1 M NaCl.

Growth is reduced by penicillin, vancomycin and kanamycin. Catabolic substrates for growth include H_2/CO_2 and methanol + H_2 but not formate, acetate, methylamine + H_2 , 2-propanol or iso-butanol and methane is produced. Vitamins, yeast extract, acetate and rumen fluids are not required but stimulate growth. DNA base composition is 37.0 mol% G+C (as determined by HPLC).

The type strain 17A1^T (= DSM 24406^T = JCM 17760^T) was isolated from the deep sediment of Lake Pavin, France.

Acknowledgments

We thank R. Nouaille, J. Bohatier, J-L. Bonnet, B. Arbeille and C. Lebos for valuable assistance. G. Borrel has benefited of a PhD grant from Region Auvergne in the Programm « Environnement » (PREVOIR) and K. Joblin acknowledges CNRS for support as a research associate.

Discussion et Conclusion du chapitre 2

L'objectif initial de l'étude 2 était de caractériser la communauté d'archées méthanogènes dans la strate sédimentaire profonde du Lac Pavin. En effet, comme souligné précédemment, les fortes concentrations en méthane, mesurées dans les sédiments (Cf. Présentation du site d'étude), laissent supposer une "intense" activité de méthanogenèse dans cette zone. Afin de caractériser la diversité, la structure et la dynamique spatiale de cette communauté métabolique, des approches d'écologie moléculaire ont été mises en œuvre. La stratégie d'utiliser des amorces généralistes (ciblant l'ARNr 16S de l'ensemble du domaine *Archaea*) plutôt que de cibler des gènes spécifiques (*mcrA*), a été privilégiée pour 3 raisons :

- Ces amorces, dont les séquences étaient disponibles dans la littérature, permettent de cibler les groupes de méthanogènes connus ou putatifs (clade TPM par exemple).
- Une précédente étude sur la communauté d'archées de la colonne d'eau anoxique avait montré que celle-ci était peu diversifiée avec une composition verticale peu fluctuante et était presque exclusivement composée de méthanogènes (Lehours *et al.*, 2007). Cette observation laissait supposer que les sédiments, au vu des concentrations en méthane, seraient également dominés par ces dernières.
- Etendre les connaissances sur les communautés archéennes des sédiments profonds lacustres.

Cette stratégie a permis de mettre en évidence, qu'à la différence de la zone pélagique anoxique, les sédiments du Lac Pavin hébergent une communauté d'archées diversifiée, spatialement hétérogène et dominée à certaines profondeurs par des lignées candidates, potentiellement non méthanogènes. Les caractéristiques physiologiques associées aux membres de ces lignées ainsi que leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes demeurent énigmatiques. Cependant, le couplage des données sur leur distribution spatiale en relation avec l'évolution des paramètres physicochimiques, nous a permis de formuler un certain nombre d'hypothèses quant à leur implication putative dans le cycle du carbone. Ces aspects ayant été largement évoqués dans la discussion de l'étude 2, ne seront discutées dans cette section que des données complémentaires relatives aux populations de méthanogènes.

I- Caractérisation des changements verticaux dans la communauté d'archées des sédiments du monimolimnion

L'abondance de la communauté d'archées des sédiments du monimolimnion est relativement stable avec la profondeur. Elle est estimée en moyenne à $3,5 \times 10^7$ cell.g⁻¹ (sédiment sec), soit un ordre de grandeur en dessous de celle des bactéries. La prédominance des bactéries sur les archées, avec un ratio bactéries/archées de 1/10 à 1/100, est classiquement observée dans les sédiments dulçaquicoles. Il est possible que ce ratio soit en partie expliqué par la distribution de l'enthalpie libre contenue dans la matière organique entre bactéries fermentatives anaérobies (>80%) et méthanogènes (<20%) (Chan *et al.*, 2005). Cependant, dans le Lac Pavin ce ratio contraste avec la codominance, voire la prédominance des archées sur les bactéries dans la zone pélagique anoxique (Lehours *et al.*, 2005).

Majoritairement composée de *Methanoregulaceae* et de *Methanosarcinaceae*, la communauté d'archées des premiers centimètres du sédiment est proche de celle caractérisée dans le monimolimnion. Ces familles sont classiquement retrouvées dans les lacs d'eau douce. Les facteurs environnementaux conditionnant leur prédominance ont été discutés dans la 3^{ème} partie de la synthèse bibliographique.

La diminution de l'abondance et de l'activité potentielle de ces 2 familles depuis la surface du sédiment vers les sédiments profonds suggère que la plus grande partie du méthane serait formée dans les premiers centimètres des sédiments. Ainsi, la présence de particules d'oxyde de fer à la surface du sédiment (Michard *et al.*, 1994), pouvant favoriser des communautés ferro-réductrices compétitrices des méthanogènes, n'aurait pas d'effet inhibiteur sur la méthanogenèse. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette absence d'inhibition :

- (i) L'acétate, unique source d'énergie des méthanogènes acétoclastes, dominantes à la surface du sédiment, serait un substrat non utilisé par les communautés de bactéries ferro-réductrices. Cette observation, réalisée par Lehours *et al.*, (2009) au cours d'une étude de la communauté ferro-réductrices de la colonne d'eau du Lac Pavin, avait conduit ces auteurs à suggérer que dans cet environnement en état d'équilibre physicochimique, les communautés métaboliques (méthanogènes, ferro-réductrices, etc.) présentaient une spécialisation marquée de l'utilisation des substrats.

- (ii) De manière générale les membres des *Methanosaetaceae* sont moins sensibles à l'inhibition directe par les oxydes de fer que les autres familles de méthanogènes (van Bodegom *et al.*, 2004).
- (iii) Les oxydes de fer à la surface du sédiment présentent des formes peu réactives. En effet, les formes amorphes du fer ferrique évoluent spontanément vers des formes plus cristallisées présentant une surface de contact réduite en comparaison des formes amorphes³². De plus, la sorption de fer ferreux sur les particules de fer oxydé peut également réduire l'accessibilité aux oxydes ferriques par les microorganismes ferro-réducteurs (Urrutia *et al.*, 1999).
- (iv) Il est possible que le taux de sédimentation des oxydes ferriques fluctue au cours de l'année, conduisant à une inhibition temporaire de la méthanogenèse dans la strate sédimentaire superficielle. Des apports plus importants pourraient ainsi résulter de la sorption de fer ferrique sur des frustules de diatomées sédimentant au printemps (Viollier *et al.*, 1997). L'oxydation de quantités importantes de fer ferreux dans la strate supérieure du monimolimnion, lors de l'abaissement de l'interface redox engendré par les brassages saisonniers, est également envisageable.

II- Place des méthanogènes obtenues en culture dans la communauté d'archées des sédiments

II.1. Les Methanobacterales

L'approche culturale menée en parallèle de l'étude 3 a conduit à l'enrichissement et à l'isolement de plusieurs méthanogènes des sédiments du Lac Pavin. Ces dernières sont capables d'utiliser l'acétate (*Methanosarcina*) ou $H_2 + CO_2$ (*Methanosphaerula* et *Methanobacterium*) comme substrats énergétiques. Les genres auxquels appartiennent ces méthanogènes ne sont cependant pas présents dans les banques de clones obtenues depuis ce même compartiment, suggérant que ces méthanogènes sont minoritaires dans la communauté d'archées. Il est néanmoins possible qu'elles puissent représenter une part importante de la communauté méthanogène aux profondeurs intermédiaires, qui n'ont pas été analysées par clonage-séquençage.

³² Surface fer amorphe $Fe(OH)_3$ = 3 à 12 fois la surfaces goethite $FeO(OH)$ = 300 fois surfaces hématite Fe_2O_3 (Zachara *et al.*, 1998).

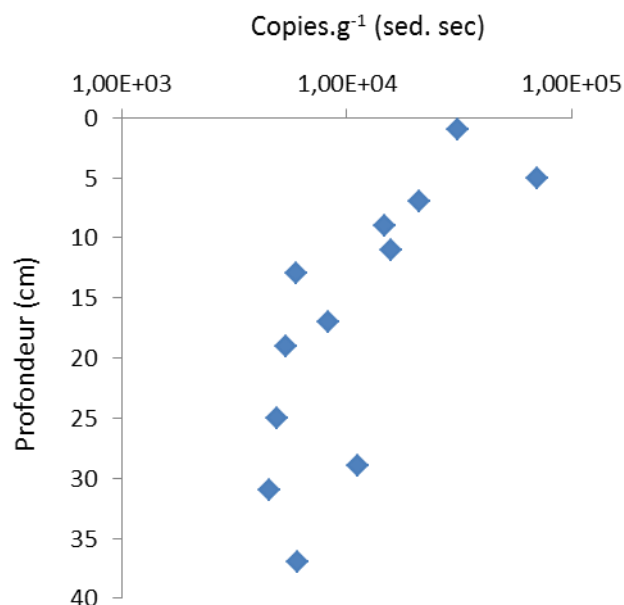


Figure 1 : Abondance des *Methanobacteriales* (en nombre de copies ADNr16S par gramme de sédiment sec). Les amorces utilisées sont MBT857F 5'- CGWAG GGAAG CTGTT AAGT -3' et MBT1196R 5'- TACCG TCGTC CACTC CTT -3' (Yu *et al.*, 2004). Les conditions pour la PCR quantitative sont les mêmes que celles décrite dans l'étude 2, avec une température d'hybridation de 56°C.

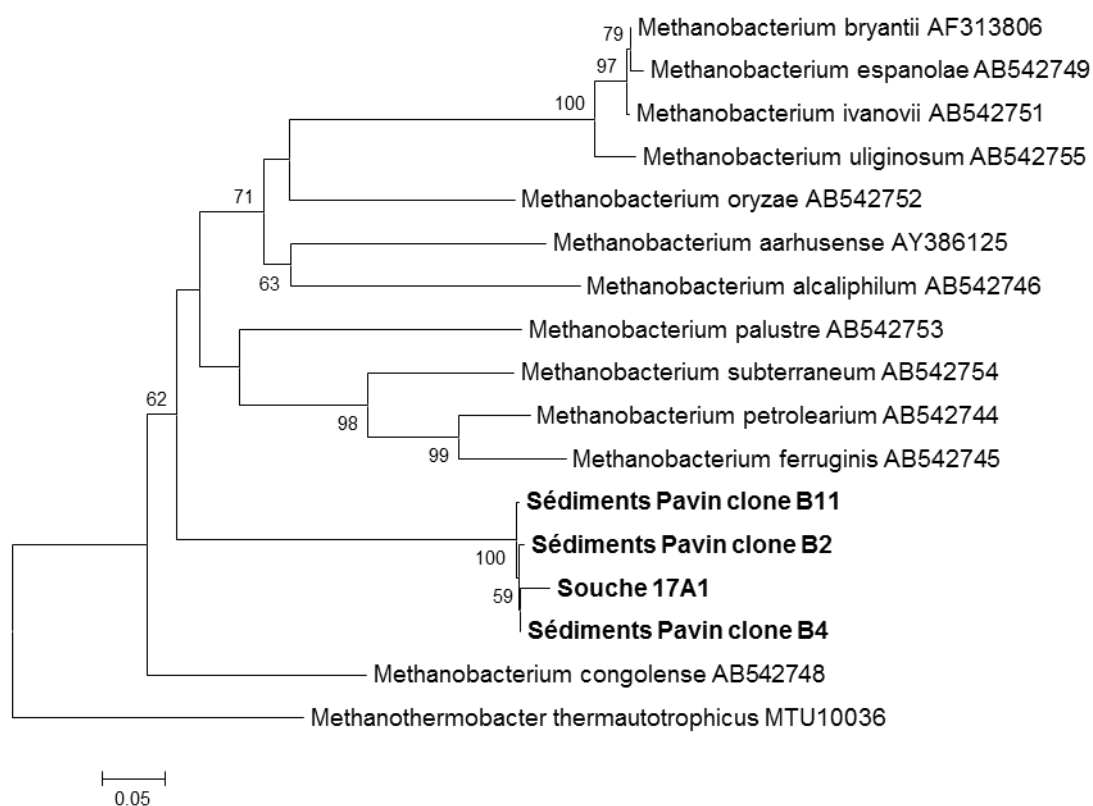


Figure 2 : Positionnement phylogénétique des séquences *mcrA* de *Methanobacteriales* des sédiments du Lac Pavin et de la souche 17A1^T. L'arbre a été construit par la méthode de neighbor joining avec 1000 bootstraps.

Cette hypothèse a été vérifiée pour les *Methanobacteriales*. L'ADNr 16S de cette lignée a été quantifié par PCR quantitative le long des 37 premiers centimètres de sédiments (Fig. 1) et les transcrits ARNr 16S ont été quantifiés dans les strates 0-3 cm et 10-13 cm. Les *Methanobacteriales* représentent une population minoritaire sur l'ensemble de la zone étudiée, leur abondance étant 2 à 3 ordres de grandeurs en dessous de celle des *Methanosarcinaceae* et des *Methanomicrobiales*. L'abondance des *Methanobacteriales* diminue avec la profondeur (Fig. 1), et le nombre de copies de transcrits ARNr 16S est plus petit dans la strate 10-13 cm (8×10^4 copies/g sed. sec) que dans la strate 0-3 cm (4.65×10^6 copies/g séd. sec). Ces résultats suggèrent que les *Methanobacteriales* participent, bien que faiblement, à la production de méthane à la surface du sédiment.

Ainsi, des méthanogènes appartenant à 3 ordres taxonomiques différents (*Methanomicrobiales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*) présentent une dynamique similaire dans les sédiments étudiés, suggérant qu'en dépit de leur distance phylogénétique et physiologiques, ces méthanogènes sont limitées par certains facteurs communs prévalant dans cet environnement.

II.2. Exemples de facteurs environnementaux prévalant dans les sédiments et pouvant conditionner la dynamique des *Methanobacteriales* : exemple de la souche 17A1^T.

Une des souches de *Methanobacterium*, 17A1^T, a été proposée comme nouvelle espèce. Sa description formelle a été présentée dans l'étude 3. Le nom de *Methanobacterium lacus* a été proposé car la souche type³³ de cette espèce est la première souche de *Methanobacterium* isolée à partir d'un lac et sa présence dans d'autres sédiments lacustres a été rapportée (sur la base de détection de séquences d'ARNr 16S ayant plus de 97% de similarité avec la séquence de 17A1^T (Nüsslein *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2002)). *Methanobacterium lacus* est représentative des *Methanobacteriales* présentes dans les sédiments du Pavin. En effet, les séquences *mcrA* de la souche 17A1^T et celles des *Methanobacteriales* des sédiments ont été séquencées et comparées. Ces séquences présentent plus de 98% de similarité (Fig. 2). Si les conditions de pH et de salinité rencontrées dans les sédiments profonds du Lac Pavin sont favorables au développement de *Methanobacterium lacus*, les températures prévalant dans ce compartiment (~5°C) sont très largement en dessous de son optimum de température (30°C). La faible adaptation de cette espèce aux basses

³³ Souche représentant une espèce procaryote.

températures pourrait expliquer qu'elle soit peu représentée au sein de la communauté d'archées méthanogènes de cet environnement. Il est aussi possible que les *Methanomicrobiales* présentes dans le Lac Pavin soient plus compétitives que les *Methanobacterales* en présence de faibles concentrations en H₂ généralement rencontrées dans ce type d'environnement. L'isolement de souches affiliées aux *Methanomicrobiales* à partir des sédiments du Lac Pavin permettra de confirmer ou non ces hypothèses.

**CHAPITRE 3 : ACTIVITE VIRALE ET
POTENTIELLE IMPLICATION DES VIRUS
DANS LA REGULATION DES COMMUNAUTES
D'ARCHEES DU SEDIMENT DU
MONIMOLIMNION**

- ETUDE 4 -

Introduction

Les deux études du second chapitre ont présenté une caractérisation de la communauté d'archées méthanogènes des sédiments du Lac Pavin ainsi que certains facteurs affectant potentiellement leur composition, leur répartition et leur activité. Le contrôle ascendant³⁴ des méthanogènes par la disponibilité en substrats énergétiques a notamment été discutée. En raison du fort contrôle descendant des virus sur la communauté microbienne de la zone pélagique anoxique (Colombet *et al.*, 2006), la question leur impact sur la communauté microbienne sédimentaire se pose. Ce contrôle n'a encore jamais été étudié dans les sédiments profonds du Lac Pavin et, de manière générale, il demeure très peu connu dans les milieux sédimentaires (Danovaro *et al.*, 2008b) et les environnements producteurs de méthane (Park *et al.*, 2007). La méthanogenèse étant potentiellement la principale voie de dégradation de la matière organique dans les sédiments du monimolimnion, les virus pourraient avoir un impact sur les taux de production de méthane par leurs interactions directes avec les archées méthanogènes mais aussi avec les bactéries situées en amont dans la chaîne de dégradation de la matière organique (bactéries fermentatives et syntrophes) ou compétitrices des méthanogènes.

L'objectif de l'étude 4 était d'examiner la possibilité d'une activité virale au sein de la strate sédimentaire du monimolimnion. Des observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées sur les 40 premiers centimètres des sédiments afin de rechercher d'éventuelles cellules infectées, d'évaluer la diversité morphotypique des particules virales et de rechercher des morphotypes potentiellement infectieux d'archées. La structure verticale de la communauté virale a été analysée par PCR-RAPD³⁵ afin d'évaluer si les changements dans la structure de cette communauté pouvaient être associés aux changements verticaux de la structure des communautés de bactéries et d'archées.

L'étude 4 a été soumise dans *The ISME journal*.

³⁴ Contrôle ascendant : contrôle par les ressources ; contrôle descendant : contrôle par la prédation ou la lyse virale.

³⁵ RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA.

Etude 4: Viral activity and unexpected viral morphotypes in the sediments of a deep-dark freshwater biosphere

G. Borrel¹, J. Colombet¹, B. Misson¹, A. Robin¹, D. Latour¹, C. Mallet¹, T. A-C. Lehours¹, G. Fonty¹ & T. Sime-Ngando^{1,*}

¹*Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II), UMR CNRS 6023, 24 avenue des Landais, BP 80026, F-63171, Aubière, France.*

*Correspondence: Téléphone Sime-Ngando, e-mail : Telesphore.SIME-NGANDO@univ-bpclermont.fr

Abstract

The significance of viral activity and its impact on prokaryotic communities in benthic environments are ambiguous. Indeed, despite the high viral particle densities and the high virus-induced prokaryotic mortality (deduced by dilution or viral decay assays) reported from these environments, no or very few visibly infected cells were generally observed. Because of the major implication of benthic prokaryotes on nutrient cycling and greenhouse gas releasing, it is crucial to gain a better understanding of their interactions with viruses. We questioned these interactions by a synoptic investigation of the visibly infected cells and the vertical changes in the abundance and diversity (morphotypic and genomic) of viruses in link with their putative bacterial and archaeal hosts. The study was conducted on the first forty centimeters of the anoxic sediments of a freshwater meromictic lake. Virus and prokaryote abundance were determined by flow cytometry. The viral morphotypic diversity and the infection of prokaryotes were examined by direct observation with a transmission electronic microscope. The vertical changes in genomic diversity were determined by the fingerprint techniques of RAPD-PCR for viruses and TTGE for archaea and bacteria. The frequency of visibly infected cells was low (max. 1 %), but, to our knowledge, corresponds to the highest value reported from benthic environments. Moreover, infected cells were observed up to the deepest part of the core. Autochthonous viral production is also sustained by the concomitant changes of viral, archaeal and bacterial genomic diversity. Viruses with unexpected morphotypes (spindle-shaped), known for infecting archaea in hypersaline and hyperthermophilic environments, were reported and suggest that archaea are also infected by viruses in cold anoxic freshwater sediments. This hypothesis is also supported by the observation of a long rod cell infected by viruses with a morphotype resembling to archaeal viruses. These results suggest a larger environmental distribution of archaeal viruses than expected and a putative implication of viruses on the regulation of methane emissions.

Introduction

Importance of viruses in the functioning of aquatic ecosystems is widely recognized (Fuhrman, 1999; Wommack and Colwell, 2000; Weinbauer, 2004; Suttle, 2005, 2007; Sime- Ngando and Colombet, 2009). However, knowledge on viral ecology is mainly based on pelagic environments and few are known about benthic systems. These environments harbor microbial communities which play crucial roles at global scale, such as nutrient recycling, production and consumption of greenhouse gases (Borrel *et al.*, 2011). It is therefore critical to gain a better understanding about ecological significance of viruses in benthic ecological processes. For example, methanogenic archaea are responsible of 6 - 16 % of the natural methane emissions in lake sediments (Bastviken *et al.*, 2004). However interactions between archaea and viruses in non-extreme environments such as freshwater lake sediments remain enigmatic. Compared to pelagic communities, benthic communities experience different physical and chemical environments which undoubtedly influence the virus/prokaryotes relationships (Noble and Fuhrman, 1997; Davey and O'Toole, 2000; Hoehler *et al.*, 2001; Hewson and Fuhrman, 2003; Middelboe *et al.*, 2003; Colombet *et al.*, 2009). Their consideration would not only supply considerable advances in our understanding of global biogeochemical cycles but also bring new insight in viral ecology.

On a volumetric basis, viral abundances in sediment exceed those in the water column by 10 to 1000 times and vary with location and depth in both marine and freshwater sediments ((Danovaro *et al.*, 2008b) a review). Diversity of viriobenthos was scarcely studied and remained largely unknown (Breitbart *et al.*, 2004b; Filippini and Middelboe, 2007; Leroy *et al.*, 2008; Helton and Wommack, 2009). Metagenomic approach (Breitbart *et al.*, 2004b), which provided evidence of an enormous genetic diversity in viriobenthos (10^4 - 10^6 viral types have been found in 1 kg of near-shore marine sediment), and pulsed field gel electrophoresis approach (Filippini and Middelboe, 2007) showed that viriobenthic assemblages did not remain absolutely consistent over time and space. These studies suggested that (i) the majority of sediment viruses did not originate from the water column (Paul *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2004), and (ii) that viruses are an active component of benthic environments. Dilution or viral decay essays indicate that viruses could control a large part of microbial activities in the sediments (Mei and Danovaro, 2004; Middelboe and Glud, 2006; Middelboe *et al.*, 2006; Corinaldesi *et al.*, 2007; Danovaro *et al.*, 2008a; Corinaldesi *et al.*, 2010). However, only low numbers or no visibly infected cells have been observed, suggesting limited effects on

Organic carbon (% solid)	Porosity (%)	Solid composition	Mean sedimentation rate (mm/year)
4-9	93.4	20 to 70 % of siliceous skeleton of diatoms 2-25% particulate iron	3.7 (on 360 years)

Table S.1: Some characteristics of the sediments of Lake Pavin

freshwater (Bettarel *et al.*, 2006; Filippini *et al.*, 2006; S  wstr  m *et al.*, 2009) and marine benthic environments (Danovaro *et al.*, 2008a). These results have led to the concept of “infectivity paradox” in which high viral abundance contrast with the low lytic infection of prokaryotes in sediments (Bettarel *et al.*, 2006; Filippini *et al.*, 2006; Danovaro *et al.*, 2008b).

The aims of this study were (i) to examine the vertical distribution in the diversity and abundance of viruses in relation to their archaeal and bacterial hosts, and (ii) to test the “infectivity paradox” with extensive direct observations of viruses and infected prokaryotes by transmission electronic microscopy (TEM). This study provides the first synoptic measurements of the morphological and genomic diversity and of the lytic infectivity at the community level of natural viruses thriving in a vertical gradient from recent up to > 130y-old sediments of a deep anoxic and dark freshwater environments.

MATERIALS AND METHODS

Study site, sampling. The Sediment core (40 cm long- 135 years of sedimentation) was collected in December 2009 using Uwitech gravity corer (UWITEC devices) in the meromictic and dimictic mesotrophic Lake Pavin (French Massif Central). The environmental context of Lake Pavin results from a stable and low sedimentation rate, with sediments of biogenic origin, high porosity (Table S.1), and high methane concentrations. Sediment subsampling was performed every centimeter (*i.e.* from 1 and 40 cm).

Extraction and determination of viral and prokaryotic densities. Viruses and prokaryotes were extracted from sediments as recommended (Danovaro *et al.*, 2001). Fixed subsamples (glutaraldehyde 1 % final concentration) were counted within 48 h following extraction, using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) as described (Marie *et al.*, 1999; Brussaard, 2004; Duhamel and Jacquet, 2006).

Viral concentration and structure of viral and prokaryotic communities. Subsamples of extracted viruses were kept unfixed, concentrated and purified using Polyethylene glycol as described (Colombet *et al.*, 2007). Viral DNA from concentrated and clean viruses was recovered after a thermal shock and purified with a Quiamp DNA mini kit (Quiagen). Absence of bacterial contamination was checked by PCR (primers ARNr 16S 27f-1492r). Structure of viral community was performed by RAPD-PCR, as described (Winget and Wommack, 2008), with some modifications. Fingerprints of prokaryotic communities were realized by TTGE.

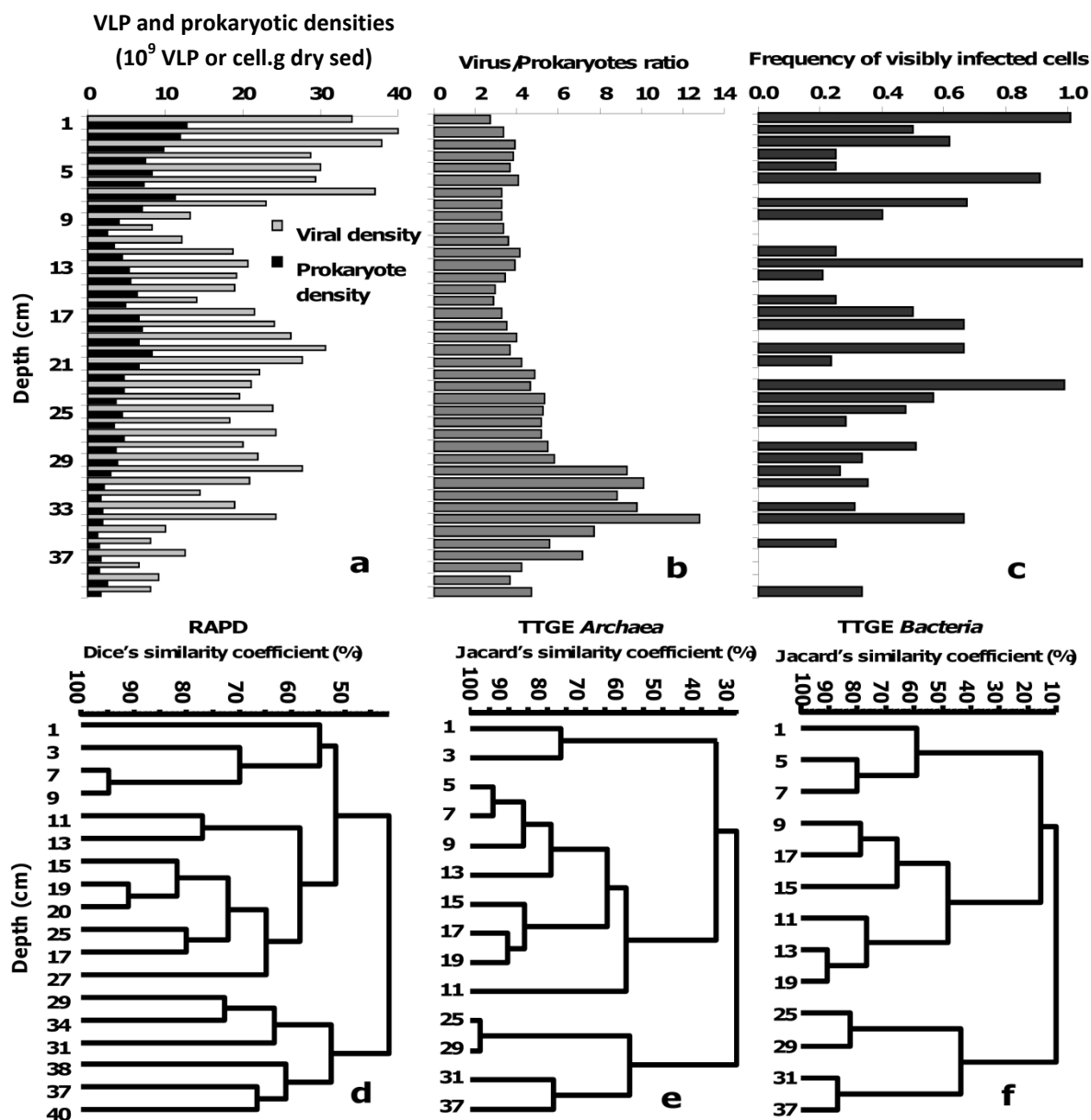


Figure 1: Vertical distribution of viral and prokaryote densities (A), virus to prokaryote ratio (B), frequency of visibly infected cells (%) (C), and viral and prokaryotes assemblages (D = RAPD dendrogram, E = DDGE *Archaea* dendrogram, F = DDGE *Bacteria* dendrogram) from sediment core of Lake Pavin.

Morphological diversity of viruses and viral infection of prokaryotes. The shape and size of VLPs, and viral infection were analysed by TEM from fixed (glutaraldehyde 1 % f.c.) concentrated subsamples or unconcentrated extracted subsamples.

Additional details on study site, sampling, experimental procedures and statistical analyses are presented in *SI Materials and Methods*.

RESULTS

Distribution of viruses and prokaryotes. Viral and prokaryotic densities averaged $21.2 \pm 8.4 \times 10^9$ virus like particles (VLPs) g^{-1} and $5.03 \pm 2.9 \times 10^9$ cells g^{-1} of dry sediment (mean \pm SD). Highest viral and prokaryotic densities were observed in surface sediments (Fig. 1A). Viral and prokaryotic densities decreased significantly with depth ($R^2 = 0.31$; $p < 0.001$; $R^2 = 0.62$; $p < 0.001$ respectively). Viral and prokaryote abundances were strongly correlated ($r = 0.80$; $p < 0.001$). The virus-to-prokaryote ratio (VPR) averaged 5.0 ± 2.3 (mean \pm SD). VPR increased significantly with depth ($R^2 = 0.39$; $p < 0.001$) and particularly from 29 to 34 cm depth (Fig. 1B).

Morphological diversity of viruses. Morphologies of the VLPs observed by TEM were highly diverse and original (Fig. 2, *SI Appendix* Fig. S.1). Among these, we encountered “typical freshwater viruses” (*SI Appendix*, Fig. S.1): (i) the head-tailed phages which included the three common families of tailed bacteriophages: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* (*SI Appendix*, Fig. S.1 a-o), (ii) the icosahedral untail particles (*SI Appendix*, Fig. S.1 p-t), and (iii) the spherical untail and enveloped particles (*SI Appendix*, Fig. S.1 u-z). Capsid and tail of these VLPs presented a large variety of sizes and forms, notably, remarkable siphovirus-like particles with tail size of at least 4800 nm (*SI Appendix*, Fig. S.1 n) or giant icosahedral VLPs with capsid diameter up to 425 nm (*SI Appendix*, Fig. S.1 t). Surprisingly we reported also lot of unexpected and uncharacterized viruses like particles (Fig. 2 a-m). Among the “unexpected viruses” in cold freshwater environment we distinguished (i) spindle-shaped particles with or without tail (Fig. 2 a-f), (ii) linear and filamentous particles (Fig. 2 g and h), (iii) bacilliform particles (Fig. 2 i), and (iv) virus with complex capsid or tail (Fig. 2 j and k). The spindle-shaped particles were divided into different morphotypes, one with a longitudinal crack (Fig. 2 a), one lemon-like particles (Fig. 2 b, d), and 3 with different forms of tail from long and thin (Fig. 2 e) to short and large (Fig. 2 c, f). Among the “uncharacterized VLPs”, with original morphologies, we

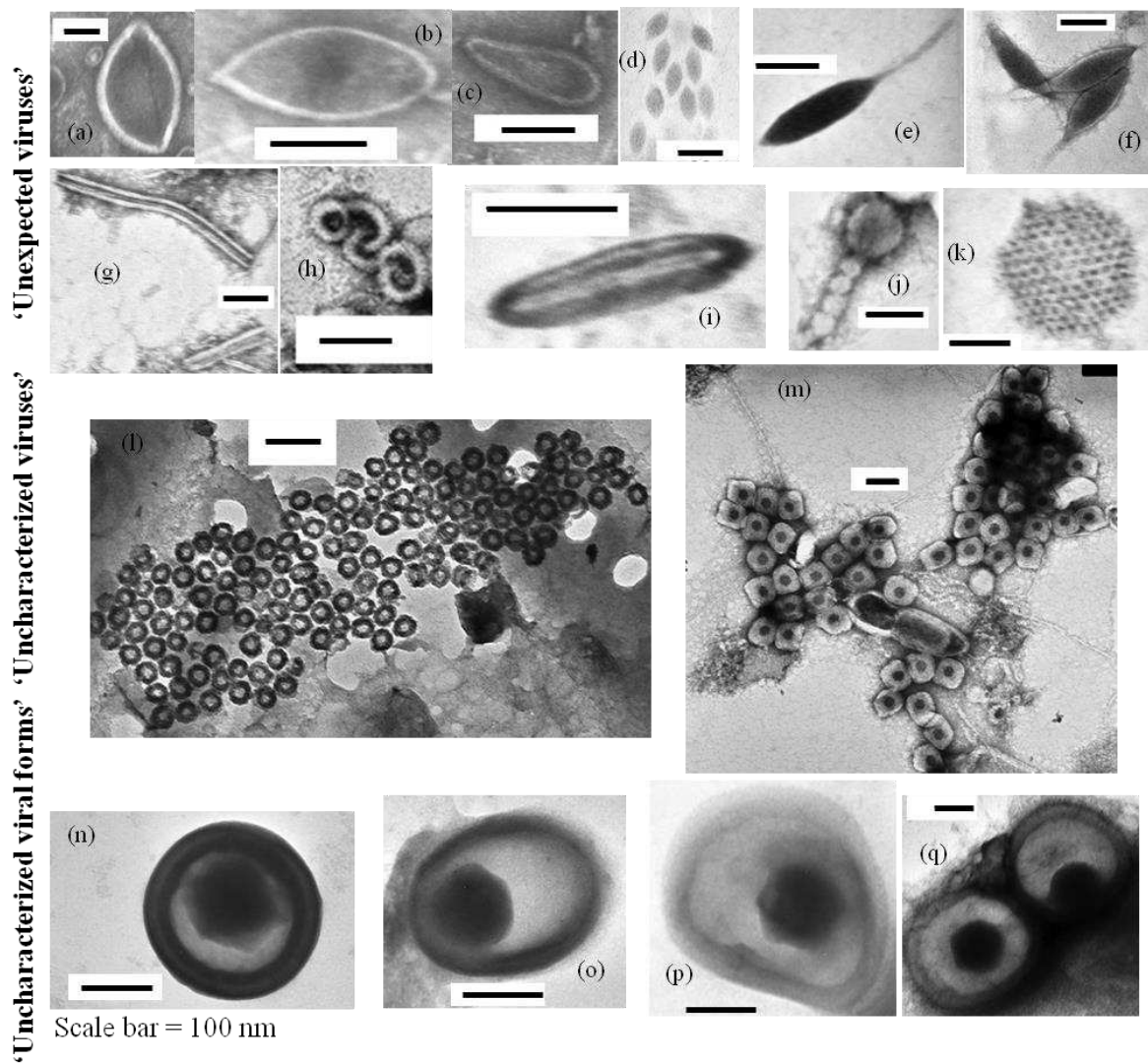


Figure 2: Transmission electron micrographs of 'unexpected viruses' (a to k), 'uncharacterized viruses' (l-m), and 'uncharacterized viral forms' (n to q) from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 100 nm.

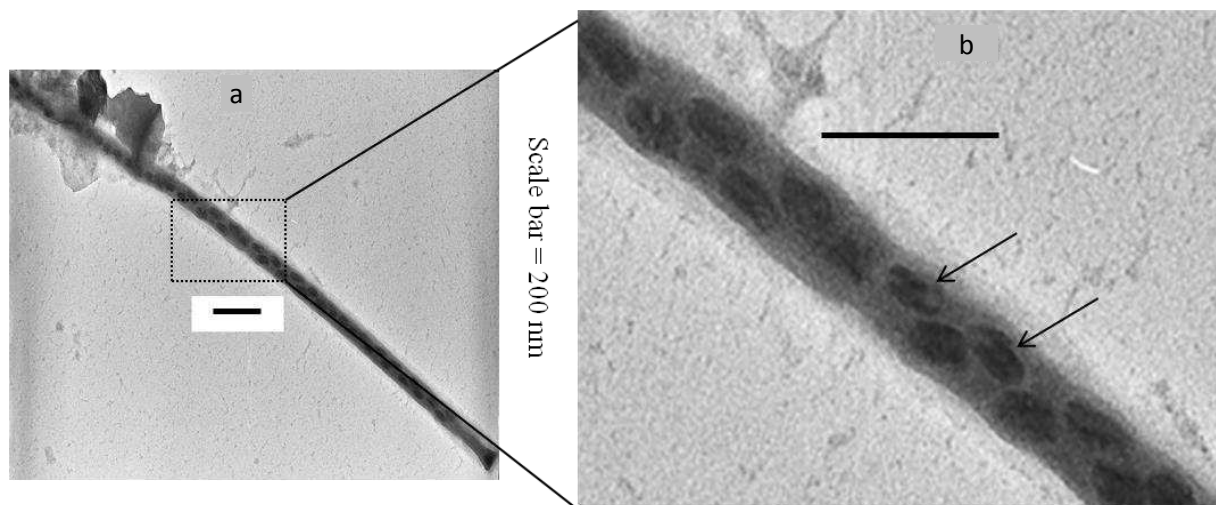


Figure 3: Transmission electron micrographs of a particular visibly infected cell from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 200 nm.

identified (i) torus-shaped particles with capsid diameters of 47.5 nm with a central hole with diameters of 17.5 nm (Fig. 2 l), and (ii) square-shaped particles with a median capsid of 78 nm and a central core with a diameter of 27 nm (Fig. 2 m).

Finally, we observed particular viral forms (Fig. 2 n-q) appearing under the shape of one VLP which varied in the capsid size between 113 and 147 nm surrounded by a double layer membrane. Total size of these particular forms ranged from 227 to 324 nm.

Viral and prokaryotic community structure. The number of PCR-RAPD bands analyzed per depth varied between 7 and 13 (mean \pm SD, 9.1 ± 2.2) and showed changes across depth (Fig. 1 D). Tree clusters representative of surface (> 10 cm), intermediate (11-27 cm) and deep (29-40 cm) sediments were observed, with within-cluster similarity ranging from 50 to 95%. Vertical structuration in 3 zones (upper, middle and lower, Fig. 1 E, F) was also reported for bacterial and archaeal communities.

Viral infection of prokaryotes. We recorded via TEM analysis 50 clearly visibly infected cells among 14 404 prokaryotes observed. Percentages of visibly infected cells (FVIC) ranged from undetectable to 1.05 % at 13 cm depth (Fig. 1 C), and decreased significantly with depth (log-log linear regression $p < 0.05$). Values higher than 0.9 % were recorded at 1, 6, 13 and 23 cm deep sediments, but viral infection was clearly demonstrated in the whole sediment core (up to 135 years of sedimentation). Interestingly, FVIC was significantly correlated to both viral ($r = 0.5$, $p < 0.01$) and prokaryotic abundances ($r = 0.4$, $p < 0.01$). Burst size ranged from 5 to 160 viruses per cell (mean \pm SD, 42.9 ± 33.1) (*SI Appendix*, Fig. S.2 a-n for examples). Most of the observed infected cells were bacilliforms from fat and short to thin and long rods. Moreover, we reported occurrence of a particular filamentous cell apparently infected by “uncharacterized VLPs” (Fig. 3 a). They seem to harbor a short rod form with a central canal like that of the figure 2 i.

In addition, VLPs were observed at the edge of some cells and were possibly coated by the cytoplasmic membrane of these cells, like a budding.

DISCUSSION

The study of viruses and their impact on benthic processes is still in its infancy. This is particularly true for freshwater sediments which were scarcely studied and only in their surficial layer (Filippini *et al.*, 2006). Our study provides the first description of the depth-related changes of viriobenthic abundances, diversity and activity in relationships with their host in deep sediments of a meromictic lake.

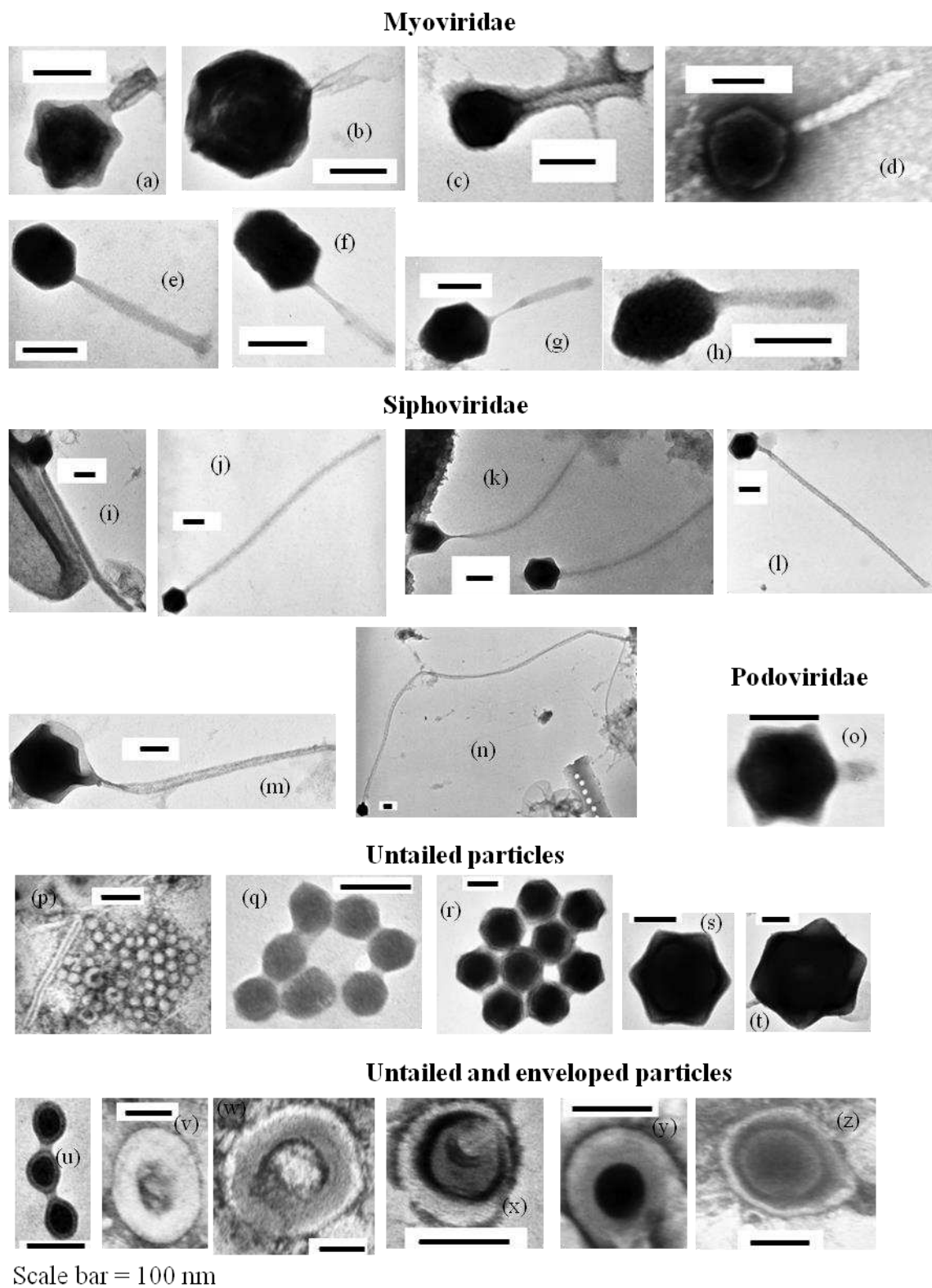


Figure. S.1: Transmission electron micrographs of VLPs from sediment core of Lake Pavin. Typical freshwater environment viruses, *Myoviridae* (a to h), *Siphoviridae* (i to n), *Podoviridae* (o), Untailed (p to t), Untailed and enveloped particles (u to z). Scale bar = 100 nm.

Viral diversity. Morphological analyses of viriobenthos highlight the existence of a high viral diversity in the sediment of Lake Pavin. Among the large range of viruses observed in these sediments, uncharacterized and unexpected morphotypes were reported (Fig. 2). These forms highly contrast with the classical morphotypes encountered in freshwater sediments (Demuth *et al.*, 1993; Middelboe *et al.*, 2003; Leroy *et al.*, 2008). Two morphotypes unreported in the International Committee on Taxonomy of Viruses, ‘torus-shaped’ and ‘square-shaped’ particles might represent novel viral phenotypes (Fig. 2 l and m) and putative new families of viruses. Diverse and complex morphotypes were found to be infectious of archaea (Prangishvili *et al.*, 2006b), suggesting that these two new morphotypes might be infectious of this domain. The occurrence of spindle-shape particles resembling to representatives of the genus of Salterprovirus or family of Fusellovirus (Fig. 2 a-f) is surprising in cold and freshwater sediments as they were only described so far to be infectious of archaea in harsh hyperthermophilic or hypersaline environments (Bath *et al.*, 2006; Prangishvili *et al.*, 2006b; Sime-Ngando *et al.*, 2011). Their presence in these sediments suggests that they might also infect archaeal lineages adapted to cold environments. This is of a great interest since it would signify that spindle shape viruses are not only associated to extreme environments or to specific archaeal lineages living in these environments but to the whole archaeal domain. Hence, it would reinforce the evolutionary hypothesis of three different virosphere, each associated to a specific domain of life (Prangishvili *et al.*, 2006b).

Numerous enveloped VLPs were observed in Lake Pavin sediments (*SI Appendix*, Fig. S.1 u-z). They were previously found to represent a large fraction of the VLP in a methanogenic digester (Park *et al.*, 2007) and may thus be specifically associated with prokaryotic communities involved in methane production.

Typical viruses of freshwater environments were also abundantly observed (*SI Appendix*, Fig. S.1). Interestingly, icosahedral viruses with remarkable sizes were frequently encountered at all depths; for example, a Siphoviridae with giant tail of at least of 4800 nm (*SI Appendix*, Fig. S.1 n), or huge untailed particles of 425 nm of diameter (*SI Appendix*, Fig. S.1 t). The mean capsid size of VLPs in this sediment (58.7 nm) was different of those in the surmounting water column (48.5 nm, (Colombet, 2008)). Moreover, numerous original VLPs morphologies have never been encountered in the surmounting water column (Colombet, 2008). This emphasizes the existence of a viral community specific to deep monimobenthic environments and supports the assumption of a benthic viral production in Lake Pavin sediments.

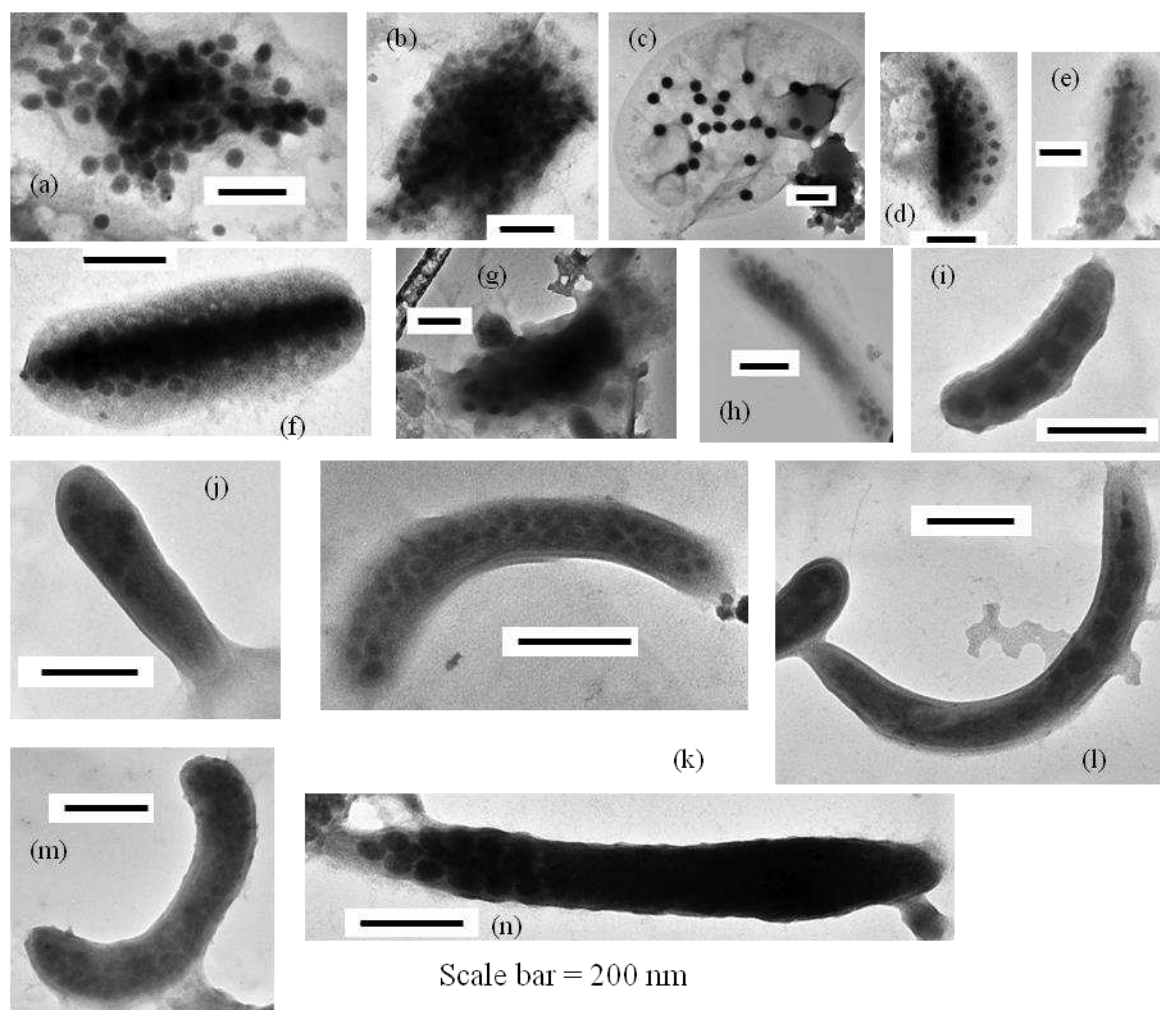


Figure S.2 : Transmission electron micrographs of visibly infected cells from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 200 nm.

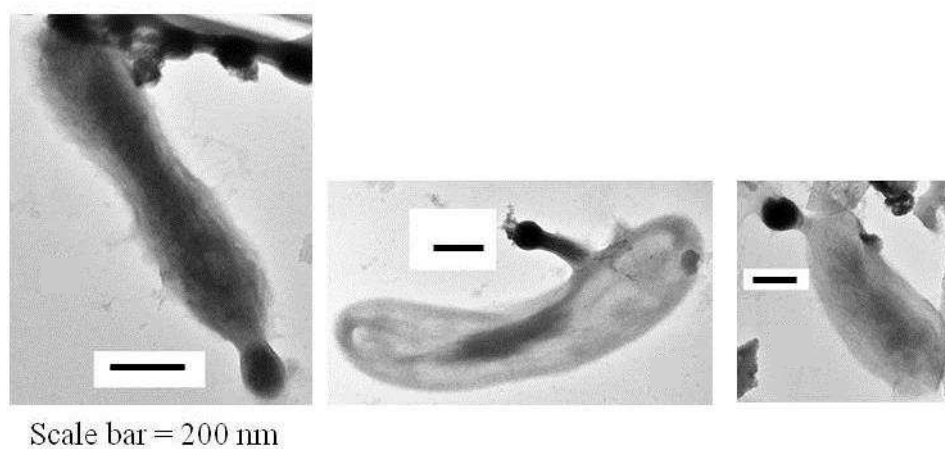


Figure S.3 : Transmission electron micrographs of cell with VLP at their edge. Scale bar = 200 nm.

Viral activity and strategies. For the first time, a direct evidence of viral lytic infection in the sediment is provided. Indeed we recorded 50 clearly visibly infected cells on the total core (average FVIC = 0.35 %). FVIC reach the remarkable rate of 1.05 % (Fig. 1C) with a mean burst size of 43 which is among the biggest identified (Danovaro *et al.*, 2008b) (for examples, *SI Appendix*, Fig. S.2). Values of FVIC reported here are undoubtedly underestimated due to potential disruption of infected cells during extraction steps (*e.g.* sonication) (Bettarel *et al.*, 2006). Moreover since the range of inactive prokaryotes in sediment is important (Haglund *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2002), the proportion of infected cells related to active prokaryotic communities must be significantly higher. Using the same method, some authors (Bettarel *et al.*, 2006; Filippini *et al.*, 2006; Danovaro *et al.*, 2008a; S  wstr  m *et al.*, 2009) reported very few, or no visibly infected cells in various sediments. The Lake Pavin sediments seem to provide hospitable conditions for viral production. Up to now, only indirect evidences of viral infection were advanced, mainly in marine sediment (Hewson and Fuhrman, 2003; Glud and Middelboe, 2004; Mei and Danovaro, 2004; Middelboe and Glud, 2006; Corinaldesi *et al.*, 2007; Corinaldesi *et al.*, 2010). However the indirect approaches used in these studies require the manipulation and incubation of sediments which are known to dramatically stimulate benthic heterotrophic activity and *de facto* viral activity (Hansen *et al.*, 2000).

Beyond the observation of infected cells in sediment, our study provides the first description of the vertical distribution of FVIC in this environment. Interestingly, viral infection was not only restricted to surface sediment but was recorded until the deeper part of the core. This observation added to the fluctuating VPR with depth (Fig. 2C) demonstrates that viruses are an active component of the sediment and not only in surface sediment. Viral lytic infectivity appeared to gently decrease with sediment depth. This is probably due to the decrease of activity of the prokaryotic community in relation with the overall decrease of reactivity of the settled organic matter with age and depth (Middelburg *et al.*, 1993)

The release of organic carbon induced by cell viral lysis might provide one of the most important sources of labile carbon (Noble and Fuhrman, 1999) in buried sediment layers disconnected from input of fresh organic matter and thus stimulate the prokaryotic metabolism. This hypothesis was proposed in deep-sea ecosystems which are also characterized by high resource limitations (Danovaro *et al.*, 2008a). Beyond the labile organic compounds, the viral lysis release cell components of various complexities such as DNA, lipids and proteins. The nucleotides might be recycled for *de novo* DNA synthesis (Danovaro *et al.*, 2008b). A recent study suggests that benthic archaea are able to recycle the isoprenoids chain of lipids from relic archaeal membrane and thus minimize their energy expenditure for

growth and maintenance (Takano *et al.*, 2010). The increase of availability of these cell components through viral lysis might promote the development of communities which have the ability to recycle them for coping with high energetic limitation.

Enveloped viruses (Fig. S.1 u-z) and remarkable forms surrounding by a loose membrane (Fig. 2 n-q) were observed. We speculate that these particles could be viruses which have been released by budding from infected cells with a part of their membrane, following chronic infection (Garoff *et al.*, 1998). This is reinforced by the presence of VLPs situated at the periphery of cells and possibly surrounded by the membrane of these cells (Fig. S.3). Interestingly these particles were mainly observed in the deeper part of the sediment (beneath 24 cm depth). Weinbauer (2004) has proposed that chronic infection might be seen as an evolutionary tradeoff of viruses under conditions of scarcity and low quality (slow growth) of virus resources (host cells). Considering this hypothesis, the chronic infection could be favored with the increase of sediment depth and the concomitant decrease of abundance and increase of the doubling time of prokaryotic populations (Parkes *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 2005; Biddle *et al.*, 2006). As the chronic infection does not lead to cell lysis, it might have a lower negative impact than lytic infection on the availability of virus resources (Pietila *et al.*, 2010). Moreover, the possibly more spread out energy invested by the host cells to produce viruses during chronic infection could be in adequacy with the permanently limiting conditions prevailing in deep sediment. On the other hand, the presence of a membrane could raise the viral resistance and thus the probability of encounter their hosts. The chronic infection in Lake Pavin sediments could also be hypothesized on the basis of the occurrence of filamentous virus like particle with helical symmetry (Fig. 2 g-h) which were generally proposed to replicate by this strategy (Hofer and Sommaruga, 2001; Middelboe *et al.*, 2003).

Link between viruses and specific host communities. As archaeal and bacterial assemblages (Fig. 2 E, F), genomic viral structure recorded by RAPD (Fig. 2 D) exhibited three groups of depths, surface, intermediate and deep depths. Added to strong link between viral and prokaryote abundances (Fig. 2A), (i) this confirm that viriobenthic assemblages are spatially dynamic and (ii) suggest that close relation are existing not only between virus and bacteria but also between virus and archaea. This reinforced by the observation of several aggregated spindle shaped and uncharacterized VLP, like after a cellular lysis (Fig. 2d, l, m). Interestingly, the infection of a sheathed rod-shape cell with flat ends was observed (Fig. 3) in the sediments of Lake Pavin. This cell shared morphological features with the archaeal

methanogenic species *Methanosaeta concilii* (Patel and Sprott, 1990). Even if there is no certitude about the identity of this infected cell, the assumption of its affiliation to *Methanosaeta* may be envisaged as this genus is one of the dominant prokaryotic groups in the surface layer of sediment of Lake Pavin (Borrel et al., 2011). Furthermore, viruses inside this cell presented “uncharacterized” phenotype, which strongly suggest that the infected cell belong the archaeal domain (Fig. 3 b). *Methanosaeta* genus has a widespread environmental distribution and is probably the predominant methane producer on earth (Smith and Ingram-Smith, 2007). Notably, this genus was detected in ~ 80 % of the freshwater lakes (Borrel et al., 2011) which might be responsible of 6 - 16 % of the natural methane emissions (Bastviken et al., 2004). Therefore, the viral infection of methanogens belonging to this genus would have a great implication in the global methane cycle. Even if few viruses of methanogens were isolated two decade ago (Wood et al., 1989; Nöling et al., 1993), the environmental control of methanogenic populations by viruses remain a vast unexplored area of research (Rohwer and Thurber, 2009).

Concluding remark

Several original results were obtained from the sediment of Lake Pavin, among them (i) observations of numerous infected cells pointing that the ‘infection paradox’ is not applicable for all types of sediment, (ii) occurrence of new viral phenotype ‘torus shaped’ and ‘square shaped’ particles possibly representing new viral families, and (iii) the observation of viruses with complex morphologies previously associated to archaea living in extreme environments (Prangishvili et al., 2006b). Viruses with exceptional morphologies were previously recorded in non-extreme environments, an estuarine sediment (Middelboe et al., 2003) and an Antarctic freshwater lake (López-Bueno et al., 2009), even if they were not reported by the authors. These observations suggest that infection of archaea by viruses would not be only restricted to extreme environments but could be larger than previously observed.

Supporting Materials and Methods

Study sites, environmental context, sediment characteristics.

Sediment samples were collected in Lake Pavin (2°53'12''E, 45°) located in the French Massif Central. Environmental characteristics of this lake were described otherwise ((Viollier *et al.*, 1997) and (Aeschbach-Hertig *et al.*, 2002)). Lake Pavin (altitude 1,197 m) is a typical meromictic and dimictic mesotrophic crater mountain lake characterized by a maximum depth of 92 m and low surface (44 ha) and catchment (50 ha) areas. A characteristic feature of the physical structure of Lake Pavin is the existence of a distinct and permanent chemocline between about 60 and 70 m depth, that separates the seasonally mixed mixolimnion from the anoxic monimolimnion. The environmental context of Lake Pavin results from a stable and low sedimentation rate, with sediments of biogenic origin, high porosity, and low solid content (*SI Appendix*, Table S1).

Sampling strategy. Sediment sampling was carried out using Uwitech gravity corer (UWITEC devices, Mondsee, Austria) at the deepest area of the lake in December 2009. The length of the core collected was about 40 cm long, representing approximately 135 years of sedimentation (see datation in (Schettler *et al.*, 2007)). Sediment subsampling was performed every centimeter (*i.e.* from 1 and 40 cm) along core (*SI Appendix*, Fig. S1.). Each subsamples corresponded to 1 cm layer of sediment which was homogenized. Determination of physicochemical parameters in the sediments was performed on fresh samples. Aliquots for viral and prokaryote abundances, for viral concentration and DNA extractions and for viral infectivity were flash frozen and kept at -20°C until further analysis.

Determination of viral and prokaryotic densities. Viruses and prokaryotes were extracted from sediments as recommended by Danovaro *et al.*, (2001). Following thawing at room temperature, sediment aliquots were diluted with a tetrasodium pyrophosphate solution (final concentration, 10 mM), shaken for 30 min, and sonicated three times 1 min each in a water bath (Bioblock Scientific 88156, 320W). Larger particles were removed by centrifugation at 800 x g for 1 min and supernatant was fixed in glutaraldehyde (1 % final concentration) and stored at 4°C. Viral and prokaryote counts were performed within 48 h following extraction, using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air-cooled laser providing 15 mW at 488 nm with the standard filter set-up. The followed procedure was described in details by Marie *et al.*, (1999), Brussaard (2004), and Duhamel and Jacquet

(2006). Briefly, extracted samples were diluted with filtered TE buffer (10 mM Tris-HCL and 1 mM EDTA, pH 8) and stained with SYBR Green 1 (10,000 fold dilution of commercial stock, Molecular Probes, Oregon, USA). Mixture was incubated for 5 min, heated for 10 min at 80°C in the dark and cooled for 5 min prior to analysis. Populations of prokaryotes and viruses differing in fluorescence intensity were distinguished on plots of side scatter versus green fluorescence (530 nm wave-length, fluorescence channel 1 of the instrument). FCM list modes were analyses using CellQuest Pro software (BD Biosciences, version 4.0). Viral and prokaryotic abundances are expressed as VLPs or prokaryotes g⁻¹ dry sediment (see sediment characteristics).

Concentration of viruses for diversity analyses. Viruses were extracted as described above and kept unfixed. The strategy employed for viral concentration and purification using Polyethylene glycol (PEG) was described in details in Colombet *et al.* (2007). Briefly, following successive prefiltration steps viruses contained in 5 ml of < 0.2 µm size-fraction of extracted subsamples were submitted to PEG precipitation. Due to the high number of virus-like-particles (VLPs) in the raw natural samples (> 7x10⁹ VLPs g⁻¹ dry sediment), the step of preconcentration by ultrafiltration classically used in the PEG-protocol was not necessary. Polyethylene glycol 8,000 (catalog no. 81268; Sigma) together with NaCl were directly added to the natural samples at final concentrations of 10 and 0.6 %, respectively, and incubated at 4 °C in the dark during 5 days. The white phase containing crystallized viruses was centrifuged at 16,000 x g for 25 min at 4 °C, and resuspended in 0.02 µm filtered water. 1 M KCl was then added, the mixture incubated on ice for 20 min and centrifuged (12,000 x g, 10 min at 4 °C). The supernatant with clean concentrated viruses was either stocked at 4°C for molecular analysis of viral diversity, or fixed in glutaraldehyde (1 % final concentration) before stocked at 4°C for microscopic examination of viral phenotypes.

Morphological diversity of viruses. The shape and size of VLPs were analyzed by transmission electronic microscopy (TEM) from concentrated subsamples or from grids used for viral infection determination. Concentrated VLPs were collected onto 400-mesh Cu electron microscopy grid supported with carbon-coated Formvar film (Pelanne Instruments, Toulouse, France). 40 µL of viral concentrate was diluted in 6 mL of 0.02 µm filtered distilled deionised water and centrifuged at 120,000 x g for 2h at 4 °C. Each grid was stained at room temperature for 30 sec with uranyl acetate (2% w/w), rinsed twice with 0.02 µm distilled water and dried on a filter paper. Grids were examined in a JEM 1200EX TEM (JEOL)

operated at 80 KV at a magnification of 40,000 x to 100,000 x. Individual morphotypes of virus-like-particles were identified from overviews (magnification of 40,000 x). Morphometric measures were done using the Axio Vision v 4.7.1.0 (2008) (Carl Zeiss).

RAPD-PCR fingerprinting of viral community. Concentrated VLP subsamples (see depth analyzed in Fig. 1) were filtrated onto 0.2 µm membrane (Amicon Ultrafree-MC, Millipore) to remove any remaining cellular micro-organisms, and treated with DNase I (Invitrogen). Viral DNA was then released by thermal chock (2 min at 100°C followed by 2 min in ice) which burst viral capsids. Quiamp DNA mini kit (Quiagen) was used to purify viral DNA. Absence of bacterial contamination was checked by PCR (primers ARNr 16S 27f-1492r).

Primer OPA-9 (5'-GGGTAACGCC-3') was used in all PCR reactions, with 20-40 ng of viral DNA serving as template in each reaction (Winget and Wommack, 2008). PCR mixtures (25 µl) contained 2.0 mM MgCl₂, 200 µM of each deoxyribonucleoside triphosphate, 4 µM of primer, and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Bioline). Reactions were carried out in an MJ Research PTC-200 thermocycler using the following parameters: initial denaturation for 3 min at 94°C; 33 cycles of 3 min at 35°C, 1 min at 72°C, and 30 s at 94°C; and a final extension of 10 min at 72°C. Ten microliters of RAPD-PCR products were visualized by gel electrophoresis on a 2% Nusieve agarose (Tebu-Bio) gel containing ethidium bromide (0.5 mg mL⁻¹) and normalized with a 100-bp size marker (Invitrogen). Resulting band patterns were analyzed using GelCompar II (version 4.50; Applied Maths). The similarity of RAPD-PCR banding patterns was determined using Dice's coefficient (presence versus absence of bands), and a dendrogram depicting banding pattern similarity was generated using the unweighted pair group method of average algorithms (UPGMA).

TTGE fingerprint of prokaryotic communities. Bacterial and archaeal 16Sr DNA genes were amplified (see depth analyzed in Fig. 7) using the set of primers 27F-GC/518R (Muyzer *et al.*, 1993) and 934F-GC/1386R, respectively (Skillman *et al.*, 2004). The PCR programs used was a 15 min hot start at 95 °C, 30 cycles consisting of denaturation (1 min at 95 °C), annealing (1 min at 60 °C), and extension (1 min at 72 °C), with a final extension for 10 min at 72 °C. PCR products were quantified with the DNA quantification kit fluorescence assay kit (Sigma-Aldrich®). PCR products were quantified with the DNA quantification kit fluorescence assay kit (Sigma-Aldrich®) and 300 ng of each sample were electrophoresed through a 8% Polyacrylamide gel (TAE 1.25x, urea 7 M, Temed 0.06 %, ammonium persulfate 0.0625 %) as previously described (Batisson *et al.*, 2007). Band patterns were

analyzed using the GelCompare 4.6 software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A 1 % band position tolerance (relative to total length of the gel) was applied in band assignment, which indicates the maximal shift allowed for two bands in different TTGE tracks to be considered as identical. Pairwise similarity matrices were calculated using the Jacard's equation from presence/absence data. Dendrograms were generated using UPGMA method (Ward, 1963).

Viral infection of prokaryotes. Extracted benthic prokaryotes in fixed samples were diluted with 0.02µm filtered water and harvested by ultracentrifugation at 70,000 x g for 20 min onto 400-mesh Cu grids. VLPs were then stained for 30 s with uranyl acetate (2% wt/wt) before examination at a magnification of x 10,000 to x 40,000 using the JEM 1200 EX TEM (JEOL) operated at 80 kV to distinguish between viral-infected and uninfected prokaryotes (Bettarel *et al.*, 2006). At least 300 prokaryotes cells were inspected per sample for Lake Pavin and a total number of 1647 prokaryotes were observed for the entire sediment core in Reservoir Grangent. Mean burst sizes (viruses.cell⁻¹) was determined by counting the number of viruses in infected cells.

Statistical analyses. Data were log transformed to satisfy the requirements of normality and homogeneity of variance which are necessary for parametric analyses. Vertical variations of data sets were analyzed with a log-log linear regression. Simple relationships between variables were tested by Pearson correlation analysis. All statistical analyses were performed with Release 12 software for windows (Minitab).

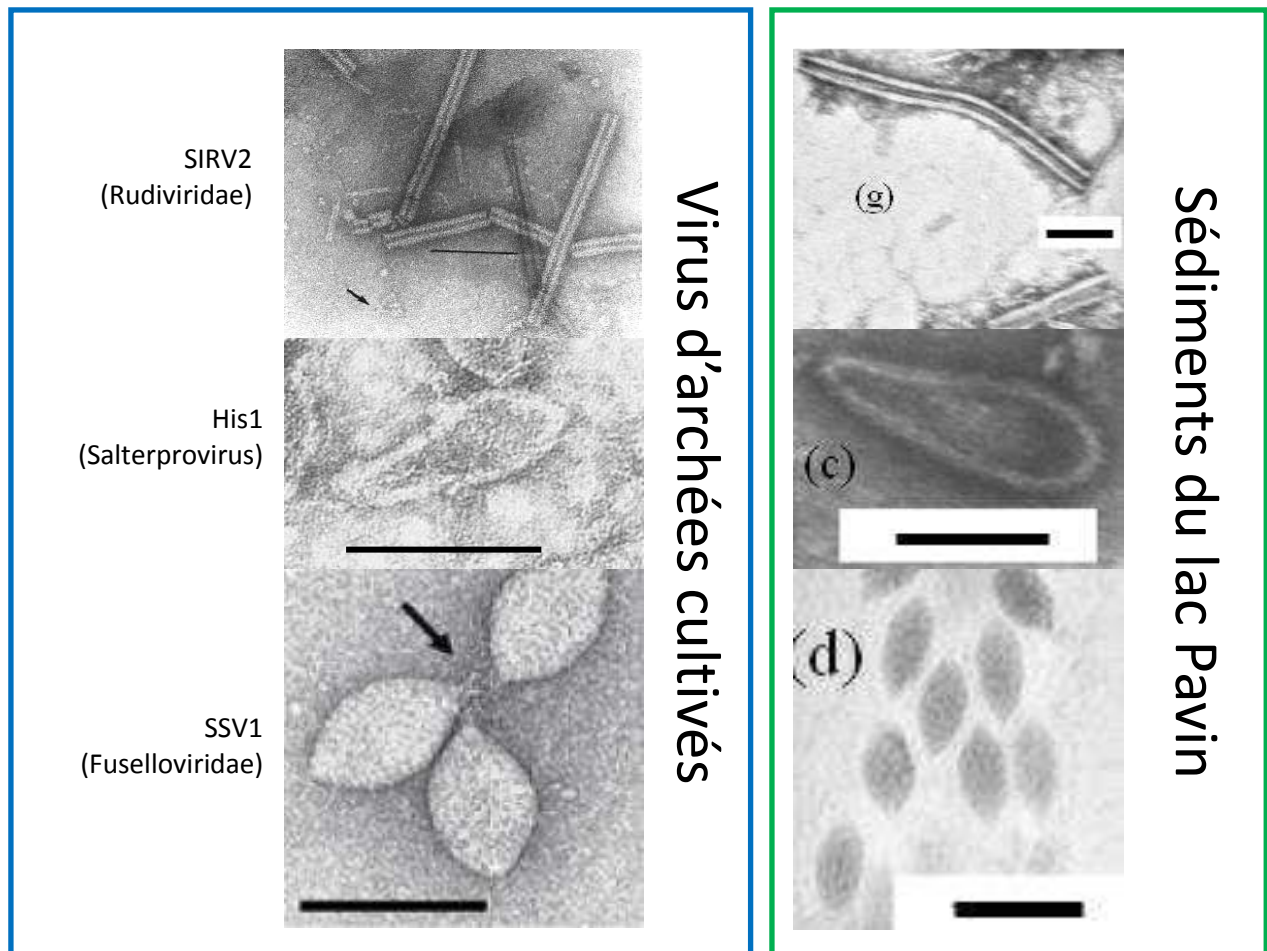


Figure 1 : Comparaison de morphotypes de virus d'archées cultivés avec des particules virales présentes dans les sédiments du Lac Pavin. SIRV2 (Prangishvili *et al.*, 1999), His1 (Bath and Dyall-Smith, 1998), SSV1 (Palm *et al.*, 1991).

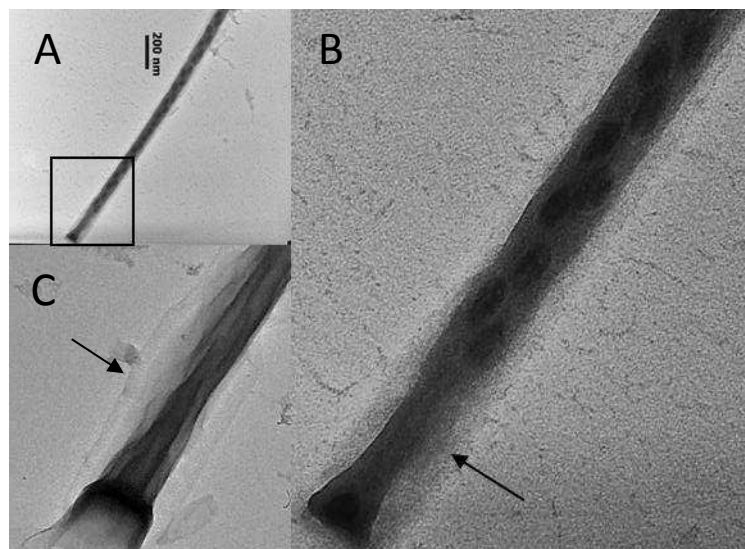


Figure 2 : Comparaison de la morphologie d'une cellule infectée par des virus allongés dans les sédiments du Lac Pavin (A et B) avec la morphologie d'une cellule de *Methanosaeta concilii* (C, souche Opfikon issue du centre de ressource biologique DSMZ). Les flèches montrent le fourreau entourant ces deux cellules.

Discussion et Conclusion du chapitre 3

De fortes concentrations virales ont été mises en évidence dans la strate sédimentaire profonde du Lac Pavin. L'observation directe de cellules infectées en microscopie électronique à transmission révèle le potentiel infectieux (cycle lytique) des virus sur les communautés microbiennes sédimentaires. L'importance quantitative de ce potentiel reste cependant à clarifier. Bien que la fréquence d'observation de cellules infectées par des virus (FVIC) soit peu élevée, cette étude rapporte, à notre connaissance, les plus hautes valeurs obtenues dans des milieux benthiques. Selon le modèle de Binder (1999), la fraction de la mortalité procaryotique induite par la lyse virale (FMVL) atteint ~10% au niveau des pics de FVIC (1 cm, 13 cm, 23 cm). Néanmoins, cette estimation se base sur un modèle développé à partir d'organismes vivants en milieu pélagique aérobie, et il est donc probable que cette valeur soit biaisée. En effet, seule une faible proportion des cellules sont actives dans les sédiments (Haglund *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2002; Mei and Danovaro, 2004). En tenant compte de cette faible fraction cellulaire active, il est possible que les virus représentent un contrôle descendant plus significatif sur la communauté microbienne benthique du Lac Pavin. Plusieurs observations microscopiques suggèrent également qu'une partie des virus pourrait être issue de cycles chroniques. Dans ce cas, leur impact sur la mortalité microbienne serait moins important.

D'autres éléments tels que le changement vertical de la structure de la communauté virale, la présence de nombreux morphotypes non-retrouvés dans la colonne d'eau et la corrélation des abondances virales et procaryotiques avec la profondeur témoignent d'une production virale autochtone, affectant donc les microorganismes de cette strate.

Si les interactions virus-bactéries sont couramment rapportées dans les environnements non extrêmes, il existe très peu de preuves d'interactions virus-archées dans ces environnements. Or, plusieurs observations réalisées dans l'*étude 4* suggèrent que les virus présents dans ces sédiments infectent des membres de la communauté d'archées. En effet, plusieurs types de particules virales présentant des formes caractéristiques de certains virus d'archées ont été observés (Fig. 1). En particulier, une cellule infectée par des virus ayant une morphologie proche des virus d'archées et présentant certains traits phénotypiques similaires aux *Methanosaetaceae* ou aux *Methanospirillaceae* a été observée (Fig. 2).

Ces observations, bien que nécessitant des études complémentaires par des approches ciblées, en particulier des essais d'isolement de couples virus-méthanogènes, sont stimulantes. En effet, les données acquises dans cette étude soutiennent l'origine autochtone des virus du sédiment et donc leur implication potentielle en tant que facteur de régulation de la communauté microbienne, dont la communauté impliquée dans le cycle du méthane.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'application des approches de biologie moléculaire à l'étude des microorganismes environnementaux a permis d'appréhender la diversité et l'ubiquité du monde microbien. Ces approches ont aussi contribué à la découverte de nouvelles voies métaboliques et à réévaluer l'impact environnemental de métabolismes décrits au cours du XX^e siècle par les approches de microbiologie classique. En outre, l'acquisition d'un nombre croissant de données moléculaires permet d'affiner notre perception des relations évolutives entre les organismes et d'avancer des hypothèses sur l'origine de la vie. Néanmoins, si l'écologie moléculaire a considérablement accru notre compréhension de la place et du rôle des microorganismes au sein de la biosphère, les informations apportées par les approches culturales apparaissent aujourd'hui plus que nécessaires, tant pour valider l'implication de microorganismes dans les cycles biogéochimiques au travers de leurs activités métaboliques, que pour déterminer les facteurs modulant leurs activités ou les interactions qui s'établissent entre les différents groupes fonctionnels d'une communauté.

L'ensemble des connaissances acquises sur la composante procaryote, outre l'intérêt cognitif qu'elles revêtent, contribue à répondre aux problématiques sociétales, telles que le retraitement et la valorisation des déchets, la gestion des écosystèmes naturels ou la compréhension des processus affectant les changements climatiques. C'est dans le cadre de ce dernier point que s'insèrent les travaux conduits au cours de ma thèse, travaux centrés sur les communautés microbiennes impliquées dans la production et la consommation d'un puissant gaz à effet de serre : le méthane. Ces travaux ont été menés sur les communautés aérobies et anaérobies du Lac Pavin. Cet écosystème constitue un site particulièrement intéressant pour l'étude des communautés impliquées dans le cycle du méthane pour les raisons qui ont été explicitées préalablement dans ce manuscrit (*e.g.* faible émission de méthane dans l'atmosphère, état stationnaire, couplage de processus d'oxydation du méthane, *etc.*). Les approches moléculaires, visant à caractériser la répartition spatiale, les zones d'activité et les

facteurs potentiellement impliqués dans la régulation des communautés ciblées ont été, au cours de ce travail, systématiquement associées à des approches culturelles afin d'acquérir des données sur la physiologie des microorganismes impliqués dans le cycle du méthane.

I- Le CH₄ : un métabolite clé de la minéralisation de la matière organique en milieu lacustre

Dans le cadre de cette thèse, une revue de synthèse (Borrel *et al.*, 2011) dressant un état de l'art sur les processus microbiens impliqués dans le cycle biogéochimique du méthane dans les systèmes lacustres a été réalisée. Les travaux conduits sur la composante procaryotique du Lac Pavin, et les collaborations que nous avons établies avec nos collègues de l'Institut de Physique du Globe et l'Université Paris VII (Projet EC2CO METHANOLAC et INTERLAC) complètent les connaissances disponibles dans la littérature, en accréditant certaines observations et/ou en proposant de nouvelles pistes d'exploration sur les communautés et les processus écogéochimiques impliqués dans le cycle du méthane.

I.1. Quelle source principale de méthane : la colonne d'eau anoxique ou les sédiments du Pavin ?

Une des perspectives émanant des premières études conduites sur le compartiment anaérobie du Lac Pavin (Lehours *et al.*, 2005; 2006; 2007) était de déterminer si la source principale de méthane était la colonne d'eau ou les sédiments anoxiques. Cette interrogation n'était pas triviale, mais essentielle, comme nous le verrons dans la seconde partie de cette discussion (Cf. section de II.2 de la discussion), à l'interprétation des profils de méthane observés dans la colonne d'eau anoxique. Compte tenu des caractéristiques très particulières de ce lac (méromicticité), il pouvait en effet être envisagé que le fonctionnement de cet écosystème ne suive pas le schéma classique plaçant les sédiments lacustres comme le compartiment le plus actif en terme de méthanogenèse (Bastviken, 2009).

L'ensemble des données microbiologiques acquises dans le cadre de cette thèse ainsi que les données géochimiques acquises ces quatre dernières années (concentrations et flux de méthane, densités et activités des méthanogènes, *etc.*) ont mis en évidence que la majorité du méthane produit serait originaire du compartiment sédimentaire (Lopes *et al.*, 2011). Le corollaire d'une activité de méthanogenèse intense dans les sédiments est la disponibilité de

substrats pour ces communautés métaboliques hautement spécialisées (Cf. revue bibliographique). Ceci sous-tend que des communautés bactériennes productrices d'hydrogène et d'acétate (substrats de la méthanogenèse) soient également actives dans ce compartiment sédimentaire, et donc qu'une fraction de la matière organique produite dans le mixolimnion soit accessible aux communautés fermentatives du compartiment sédimentaire profond.

I.2. Les méthanogènes : Composition et structure des populations

Détectées sur l'ensemble de la colonne d'eau anoxique, les méthanogènes sont principalement affiliées aux deux principaux ordres rencontrés dans les milieux lacustres (Auguet *et al.*, 2010) : les *Methanosarcinales* (représentées par le genre acétoclaste *Methanosaeta*) et les *Methanomicrobiales* (représentées par la famille hydrogénotrophe des *Methanoregulaceae*). Cependant, les proportions respectives de chacune de ces deux familles dans la communauté méthanogène sont inversées entre les études de Lehours *et al.*, (2007) et de Biderre-Petit *et al.*, (2011). Il est possible que cette divergence soit liée à un biais dû à l'utilisation d'amorces différentes pour cibler ces communautés. Afin de tester cette hypothèse il serait nécessaire de cloner et de séquencer les amplicons obtenus à partir d'un même échantillon, pour chacun de ces deux couples d'amorces.

- Si les différences observées ne résultent pas de biais liés aux amorces, ceci implique que les proportions relatives de ces deux lignées, et potentiellement leur contribution à la production de méthane, sont variables dans le temps. Considérant le "steady state" physico-chimique du monimolimnion, l'hypothèse avait été posée, lors des premières études microbiologiques conduites sur cet environnement, que les variations saisonnières de l'activité et de la composition des communautés microbiennes devaient être « négligeables ». Cependant, il a été montré récemment que l'abondance des procaryotes était variable dans le monimolimnion (Colombet *et al.*, 2009). Ces changements temporels d'abondance soulèvent la question d'une possible succession saisonnière de la composition de la communauté procaryote incluant une alternance des *Methanosaeta* et les *Methanoregulaceae*. Ainsi il serait intéressant d'analyser la variabilité temporelle de l'importance relative de la méthanogenèse hydrogénotrophe et acétotrophe dans la colonne d'eau.
- Si la divergence dans les proportions relatives des *Methanosaeta* et des *Methanoregulaceae* provient d'un biais méthodologique lié au couple d'amorces

utilisé, il sera nécessaire d'appréhender l'importance relative de ces lignées dans la production de méthane par d'autres approches. L'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques pourra permettre de suivre l'évolution temporelle de la densité de ces populations. Leur contribution à la production de méthane pourra également être déterminée en réalisant des incubations en présence et en absence d'inhibiteur de la méthanogenèse acétoclaste (fluorure de méthyl) et de la méthanogenèse totale (2-bromoéthanesulfonate) (Metje and Frenzel, 2007).

Dans tous les cas (biais d'amorces ou non), la détermination de la contribution relative de ces 2 groupes par des mesures d'activité et la variation saisonnière de cette contribution fourniront des données importantes pour les approches de modélisations.

I.3. La méthanogenèse acétoclaste est-elle la principale voie de formation du méthane ?

En dépit de l'existence possible d'une variabilité saisonnière qui, comme nous l'avons souligné, devra faire l'objet d'études ciblées, la méthanogenèse acétoclaste est probablement la principale voie de formation du méthane dans le compartiment anoxique profond (colonne d'eau et sédiment). Cette affirmation peut apparaître péremptoire au vu des données que nous avons acquises. Cependant, un certain nombre d'observations et les données de la littérature (cf. revue bibliographique), accréditent cette hypothèse.

- Les faibles températures (5°C dans le monimolimnion du Lac Pavin, Cf. présentation du site d'étude) limitent l'activité des microorganismes producteurs d'hydrogène et limitent donc indirectement la méthanogenèse hydrogénotrophe (Cf. revue bibliographique).
- L'acétate n'apparaît pas être un substrat préférentiel pour les microorganismes ferro-réducteurs, compétiteurs directs des méthanogènes pour l'acquisition des substrats issus de la fermentation, dans la strate profonde du Lac Pavin (Lehours *et al.*, 2009).
- La signature isotopique du méthane, déterminée par nos collègues de l'IPGP, révèle que le méthane semble principalement produit à partir du groupe méthyl de l'acétate (Cf. présentation du site d'étude)
- Les densités des *Methanosarcinales*, déterminées par hybridation *in situ*, sont significativement corrélées aux concentrations en méthane dans le monimolimnion (Lehours *et al.*, 2005).
- L'étude menée sur la communauté d'archées des sédiments au cours de cette thèse (Borrel *et al.*, soumis) a mis en évidence que les lignées méthanogènes dominantes dans ce compartiment étaient similaires à celles présentes dans la colonne d'eau. Dans les trois

banques de clones, la proportion des *Methanosaetaceae* est supérieure à celle des *Methanomicrobiales*. Néanmoins, le profil d'abondance de ces lignées a montré que suivant la profondeur, chacune d'elle pouvait dominer la communauté méthanogène.

I.4. Facteurs environnementaux affectant l'activité des méthanogènes dans la zone anoxique du Lac Pavin.

Au cours de cette thèse, nous avons ciblé les transcrits des gènes *mcrA* et les ARNr 16S afin de déterminer les zones où les méthanogènes sont préférentiellement actifs. Bien que les méthanogènes soient présentes dans la chémocline, leur activité semble être fortement restreinte dans cette zone. Cette limitation est probablement due à la présence d'accepteurs inorganiques d'électrons favorisant des communautés métaboliques (sulfato-réductrices, ferro-réductrices) plus compétitives pour l'acquisition des substrats de la méthanogenèse. L'étude menée sur le sédiment montre que l'activité des méthanogènes est la plus importante au niveau de la couche superficielle et diminue avec la profondeur. Ce résultat révèle qu'en dépit de l'éventuelle activité de ferro-réduction en surface des sédiments, la méthanogenèse n'est pas fortement inhibée. Contrairement à d'autres lacs d'eau douce (Kuivila *et al.*, 1989; Koizumi *et al.*, 2003), les accepteurs inorganiques d'électrons ne constituent pas un facteur prépondérant dans la répartition des méthanogènes dans le sédiment du monimolimnion du Lac Pavin. Nous avons fait l'hypothèse que la diminution de la labilité de la matière organique totale était le principal facteur affectant la diminution de l'activité et de l'abondance des méthanogènes avec la profondeur dans le sédiment. En effet, les méthanogènes sont un groupe métabolique spécialisé dans l'utilisation d'un faible nombre de substrats simples issus de la dégradation de la matière organique complexe. Leur activité dépend donc indirectement de la biodégradabilité de la matière organique complexe du sédiment.

La présence de fortes concentrations en méthane en profondeur, où les *Methanosaetaceae* et les *Methanomicrobiales* sont moins abondantes et probablement moins actives soulève la question de l'activité d'autres groupes méthanogènes encore non identifiés. Il est néanmoins possible que cette accumulation soit liée à la faible diffusion du méthane en profondeur et à une activité faible mais suffisante des *Methanosaetaceae* et des *Methanomicrobiales* pour engendrer cette accumulation.

I.5. Des taxons de méthanogènes « adaptés aux environnements lacustres » ?

En dépit des différences observées dans les proportions relatives des taxons de méthanogènes (Lehours *et al.*, 2007; Biderre-Petit *et al.*, 2011), il est important de noter que malgré le fort particularisme du Lac Pavin, les principaux acteurs de la méthanogenèse sont comparables à ceux identifiés dans la grande majorité des lacs d'eau douce (Cf. revue bibliographique). Il est donc possible que les membres de ces taxons soient particulièrement adaptés aux conditions prévalant dans les lacs, quel que soit le niveau trophique et la fréquence des perturbations physicochimiques liées au brassage de la colonne d'eau. Un facteur explicatif de cette homogénéité de composition est la faible disponibilité des substrats de la méthanogenèse dans les sédiments lacustres. En effet ce facteur favoriserait la présence des *Methanosaetaceae* plutôt que celle des *Methanosarcinaceae* (Jetten *et al.*, 1992) et la présence des *Methanoregulaceae* plutôt que celle des *Methanobacteriaceae* (Sakai *et al.*, 2009). Il est aussi important de considérer que les communautés méthanogènes des lacs d'eau douce ont principalement été étudiées au niveau de l'hypolimnion et des sédiments profonds où les températures sont généralement inférieures à 15°C. Il est donc possible que cette homogénéité de composition soit en partie liée à ce facteur et que les communautés de méthanogènes soient différentes dans les sédiments plus chauds des zones littorales et des lacs tropicaux, encore peu étudiés (Borrel *et al.*, 2011). En plus de la faible disponibilité en substrat, les faibles températures pourraient défavoriser les *Methanobacteriales* dans les milieux lacustres et notamment dans le Lac Pavin où elles sont 1000 fois moins abondantes que les *Methanosaetaceae* et les *Methanomicrobiales*. Cette hypothèse est appuyée par la caractérisation écophysologique d'une nouvelle espèce, *Methanobacterium lacus*, isolée à partir des sédiments du Lac Pavin (Borrel *et al.*, in press), et qui vient enrichir le faible nombre d'espèces méthanogènes isolées à ce jour à partir des lacs d'eau douce. Cette souche, représentative des *Methanobacteriales* du Lac Pavin et des *Methanobacteriales* présentes dans d'autres lacs d'eau douce, exhibe une très faible croissance en dessous de 15 °C.

I.6 Une "banque de graines" méthanogènes

Au travers de la diversité des genres identifiés uniquement par les approches culturelles (*Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanosphaerula*), il apparaît clairement qu'un pool important, probablement encore largement sous-estimé, d'espèces faiblement représentées (espèces rares, < 0,1 % du total), est présent au sein des communautés de méthanogènes. Il est surprenant que ces espèces spécialisées et peu compétitives dans ce milieu ne soient pas complètement exclues par les deux taxons dominants. Leur enrichissement dans nos milieux de culture suggère que ce pool peut s'apparenter à une "banque de graines" à partir de laquelle

certaines espèces peuvent être recrutées lorsque les conditions environnementales sont modifiées. Nous pouvons faire l'hypothèse que les fortes températures et quantités de substrats (par rapport aux conditions *in situ*) offertes par les conditions de culture utilisées soient les principaux facteurs ayant permis leur recrutement *in vitro*, au détriment des taxons majoritairement présent *in situ*. Les variations de ces deux facteurs en milieu lacustre pourraient les favoriser ponctuellement et permettre leur maintien à long terme. Les températures ne variant pas au niveau des sédiments du monimolimnion, il est possible que le maintien de ces espèces soit lié à l'enrichissement transitoire de substrats de la méthanogenèse lors des pics saisonniers de sédimentation phytoplanctonique. D'autres hypothèses expliquant leur maintien peuvent être formulées : (i) ces espèces minoritaires sont actives dans des niches particulières, (ii) en dormance ou sous forme de résistance, (iii) importées régulièrement depuis le milieu environnant.

1.7. La physiologie des méthanogènes dominants les systèmes lacustres reste inconnue...

Afin d'initier un certain nombre de réponses sur les hypothèses des deux sections précédentes, en particulier sur les interactions et la coexistence d'espèces en compétition, il serait essentiel d'appréhender l'écophysiologie des souches affiliées aux différents genres de méthanogènes. Ceci permettrait de déterminer leur affinité pour les substrats, leur potentiel compétitif et les facteurs conditionnant leur activité optimale (T°C, pH, etc.). Cependant, bien que majoritaires dans les milieux lacustres dulçaquicoles, aucune espèce de *Methanosaetaceae* ou de *Methanoregulaceae* provenant de ces milieux n'a encore été isolée et décrite à ce jour. Cet état de fait est la résultante probable de biais culturels éprouvés lors de l'isolement de souches, comme ce fut le cas dans le cadre de cette thèse. Les milieux classiquement utilisés favorisent les espèces à fort taux de croissance et faible affinité pour le substrat au détriment des espèces à faible taux croissance et forte affinité pour le substrat qui sont vraisemblablement plus compétitives et abondantes dans de nombreux environnements naturels. Des approches culturelles mimant de manière plus réaliste les faibles concentrations en substrats disponibles dans l'environnement permettront probablement d'accéder à l'isolement de souches d'archées méthanogènes issues de la fraction dominante des communautés microbiennes des écosystèmes. Ces techniques d'enrichissement prometteuses et encore peu utilisées incluent, par exemple, la co-culture sur des métabolites intermédiaires de la voie de dégradation anaérobie de la matière organique (propionate, isopropanol...) (Janssen, 2003; Sakai *et al.*, 2009).

II- Régulation des émissions de méthane

II.1 Hypothèses sur les voies de transport du méthane

Les profils de méthane et les mesures des émissions réalisées par nos collègues du Laboratoire de Physique et Chimie de l'Environnement et de l'Espace (LPCEE-Orléans) mettent en évidence que Lac Pavin émet très peu de méthane en comparaison d'autres lacs tempérés (Guimbaud *et al.*, soumis ; Cf. présentation des sites d'études). Les caractéristiques de sa colonne d'eau fournissent donc certainement des conditions particulièrement favorables à l'oxydation de ce métabolite. En particulier, les forts gradients physico-chimiques présents au niveau de l'interface redox ralentissent probablement les flux de méthane depuis le monimolimnion, permettant une meilleure efficacité de sa consommation. En effet, la diffusion est la voie de transport du méthane rendant ce métabolite le plus accessible à sa consommation par les microorganismes méthanotrophes (Bastviken, 2009).

Les caractéristiques géomorphologiques du Pavin, conditionnant sa méromicticité, peuvent limiter la contribution des autres voies de transport du méthane. En effet, les brassages de la colonne d'eau étant incomplets dans le Lac Pavin, seule une petite partie du méthane accumulé dans la zone anoxique est transportée lors de ces événements saisonniers. De plus, la faible surface de sédiments épilimniques pourrait défavoriser le transport par ébullition. Enfin, en raison de l'infime surface du lac couverte par des macrophytes émergés, le transport par les plantes doit être négligeable. La mesure des émissions liées au transport par ébullition et par convection lors des brassages permettrait d'avoir une meilleure estimation des quantités réelles de méthane émises par le lac à l'échelle de l'année.

Outre l'importance relative des différentes voies de transport du méthane, la combinaison des deux processus d'oxydation du méthane (aérobie et anaérobie) contribue certainement à fortement limiter les émissions de ce gaz depuis le Lac Pavin.

II.2. Méthanotrophie aérobie

Dans le cadre de la discussion sur les communautés de méthanotrophes aérobies, un certain nombre d'observations rejoignent des problématiques globales discutées dans la section sur les méthanogènes (biais culturels, espèces rares, etc.). Nous ne reviendrons donc pas en détail sur ces aspects qui seront simplement évoqués.

II.2.a. Activité des méthanotrophes aérobies dans la colonne d'eau

Les méthanotrophes aérobies ont été détectées sur un large intervalle dans la colonne d'eau (à 20 m et entre 50 et 75 m de profondeur, Biderre-Petit *et al.*, 2011). L'activité des méthanotrophes aérobies a été appréhendée par l'amplification des transcrits du gène *pmoA*. En accord avec les résultats de modélisation (Lopes *et al.*, 2011) qui situent la majeure partie de l'oxydation aérobie du méthane entre 55 et 62 m, les transcrits *pmoA* ont été amplifiés entre 50 et 65 m de profondeur. Aux deux extrémités de cette zone, les concentrations en oxygène ou en méthane sont extrêmement faibles (voire indétectable pour l'oxygène à 65 m). Ceci suggère que les méthanotrophes aérobies, détectées au-dessus ou en dessous de cette zone 50-65 m, ont une très forte affinité pour l'oxygène et/ou pour le méthane. Le changement de proportion entre les deux OTUs dominants le long du gradient opposé de méthane et d'oxygène, entre 50 m et 65 m de profondeur (Biderre-Petit *et al.*, 2011), suggère que les espèces représentées par ces OTUs puissent avoir des affinités opposées pour le méthane et l'oxygène.

II.2.b. *Methylobacter* : superconsommateur de méthane dans les lacs

Bien que les trois types de méthanotrophes affiliées aux *Proteobacteria* aient été détectés dans la colonne d'eau du Lac Pavin, les méthanotrophes de type I sont largement dominantes en termes d'abondance et sont les seules dont l'activité ait été détectée. Ces résultats reflètent ceux obtenus dans la plupart des lacs étudiés et à ce jour, plus de 60 % des séquences d'ARNr 16S issues de lacs sont affiliées au type I dans la base de données NCBI (Borrel *et al.*, 2011). Comme dans le Lac Pavin, la plupart de ces séquences ont une forte similarité avec celle de l'espèce psychrophile *Methylobacter psychrophilus* ou l'espèce psychrotolérante *Methylobacter tundripaludum*. Il semble donc que la température joue un rôle important dans la composition des communautés de méthanotrophes lacustres. La dominance du type II ou du type I a été plusieurs fois expliquée par le ratio CH_4/O_2 (Amaral and Knowles, 1995; Henckel *et al.*, 2000; Pfluger *et al.*, 2011). Dans le cas du Lac Pavin les deux espèces actives sont affiliées au type I et sont présentes à fort et faible ratio CH_4/O_2 . La faible température pourrait donc prévaloir sur ce ratio. Un autre facteur pouvant potentiellement expliquer la dominance du type I sur le type II dans les zones pélagiques tient à la production d'exopolysaccharides par les méthanotrophes de type II. Les gangues formées par ces exopolysaccharides pourraient ainsi accroître leur taux de sédimentation par agglomération des cellules. Ce phénomène d'agglomération a été observé pour les souches de

type II isolées à partir du Pavin (Cf. figure 31D de la synthèse bibliographique, page 84, et la figure 2 de la deuxième partie du premier chapitre, page 184) et les expérimentations réalisées en microcalorimétrie ont montré que la croissance de ces souches était rapidement et fortement limitée par leur sédimentation lorsque le milieu n'était pas agité.

II.2.c. Methylocystis

Les methanotrophes affiliées à *Methylocystis* ont uniquement été détectées à 20 m de profondeur par les approches moléculaires. Il est possible que leur représentativité soit plus importante encore dans les 20 premiers mètres de la colonne d'eau et qu'elles soient particulièrement impliquées dans la consommation du méthane provenant des sédiments littoraux. Il est également possible que ces *Methylocystis* proviennent des sédiments littoraux, où leur proportion dans la communauté méthanotrophe peut être importante dans d'autres lacs, tel que le Lac de Constance (Pester *et al.*, 2004). Les souches de *Methylocystis* isolées au cours de cette thèse constituent des modèles d'étude préliminaire pour déterminer les facteurs influençant la répartition et l'activité des méthanotrophes aérobies en milieu lacustre.

II.3. Oxydation anaérobie du méthane : Importance, microorganismes impliqués et perspectives pour l'étude de ce processus en milieu aquatique continental

II.3.a. L'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification : le processus clé des systèmes aquatiques d'eau douce ?

Le processus d'oxydation anaérobie du méthane est encore très peu connu en milieu dulçaquicole. Son existence dans le Lac Pavin a été suggérée par les expérimentations préliminaires réalisées en microcalorimétrie au cours de cette thèse, et est soutenue par les données de modélisation (Lopes *et al.*, 2011). D'après ce modèle, trois voies d'oxydation anaérobie du méthane sont théoriquement possibles dans la colonne d'eau, la voie principale impliquant un couplage avec la dénitrification (NDMO). Ce processus réalisé par les bactéries du clade NC10 a récemment été mis en évidence dans les sédiments du Lac de Constance par l'utilisation de $^{14}\text{C}_{\text{CH}_4}$ et d'amorces ciblant spécifiquement le gène *pmoA* du clade NC10 (Deutzmann and Schink, 2011). Les prévisions du modèle élaboré pour le Lac Pavin s'accordent aux résultats de cette dernière étude. Il a ainsi été estimé que le taux d'oxydation du méthane lié au processus NDMO serait un ordre de magnitude inférieur à celui de l'oxydation aérobie. Ces valeurs suggèrent que ce métabolisme pourrait participer, de manière significative, à la limitation des émissions de méthane par les écosystèmes aquatiques.

II.3.b. Recherche de groupes taxonomiques clairement identifiés dans le processus de NDMO

Les preuves irréfutables de l'implication de microorganismes dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane dans le Lac Pavin doivent encore être établies. Ces dernières devront s'attacher à :

- i) Identifier des microorganismes méthanotrophes anaérobies connus par des approches moléculaires ciblant le gène *pmoA* des NC10.
- ii) Enrichir des méthanotrophes anaérobies connues ou encore inconnues.
- iii) Tracer l'incorporation de méthane marqué ^{13}C dans des composés cellulaires (acides nucléiques/lipides).

Dans un premier temps, des profils de la composition isotopique du méthane dans la colonne d'eau et les sédiments permettront d'accréditer ce processus et de définir les zones où les taux d'oxydation sont les plus importants. Cependant, si la majeure partie du processus NDMO a lieu en étroite proximité avec l'oxydation aérobie du méthane, tel que proposé par le modèle de Lopes *et al.*, (2011), il ne sera pas possible de les distinguer en analysant la composition isotopique du CH_4 et du CO_2 . Une première évaluation de la présence ou de l'absence de microorganismes connus impliqués dans le NDMO pourra être réalisée en utilisant les amorces dessinées récemment par Luesken *et al.*, (2011). Si des gènes *pmoA* affiliés à NC10 sont détectés, il pourra être envisagé de quantifier les transcrits par RT-PCR quantitative afin de déterminer les zones où ce processus est le plus important. Cette étape sera également un préalable afin d'échantillonner les strates les plus pertinentes pour réaliser des cultures d'enrichissement et des incubations sous $^{13}\text{C}\text{-CH}_4$.

II.3.c. D'autres processus d'oxydation anaérobie du méthane impliquant d'autres groupes taxonomiques ?

Les *Archaea* classiquement impliquées dans le processus d'oxydation anaérobie du méthane, les ANME, n'ont pas été détectées dans le Lac Pavin. Néanmoins, l'implication possible des lignées candidates d'archées, les TPM, les MBG-D et les MCG dans le processus d'OAM a été discutée au cours de ce manuscrit. Afin d'établir les facteurs environnementaux contrôlant la distribution et l'activité de ces lignées, une caractérisation sans isolement préalable, telle que décrite par Kemnitz *et al.*, (2005), pourra être réalisée. Cette

caractérisation repose sur la détermination des modifications d'abondance d'une ou de plusieurs lignées au sein d'une communauté complexe soumise à différentes contraintes physico-chimiques ou amendées avec différents types de substrats et/ou d'inhibiteurs. L'influence d'inhibiteurs de la méthanogenèse et de la méthanotrophie anaérobie pourra être testée afin de vérifier le potentiel lien entre les membres de ces groupes et le cycle du méthane. L'influence de la présence de méthane et de divers accepteurs inorganiques d'électrons pourra aussi être examinée. Les amorces dessinées au cours de cette thèse seront des outils pertinents pour suivre les changements d'abondance et d'activité des MBG-D et des TPM en réponse aux facteurs testés. L'utilisation de sondes disponibles dans la littérature (Schubert *et al.*, 2011) pour l'hybridation *in situ* des membres de ces lignées permettra de détecter d'éventuelles associations syntrophiques, telles que celles observées dans le cadre de la SDMO en milieu marin.

II.3.d. Une attention particulière pour la lignée MBG-D

Une des lignées d'archées dominante dans les sédiments du Lac Pavin, MBG-D, a particulièrement attiré notre attention. En effet, MBG-D est largement distribuée dans les milieux benthiques, auxquels ces membres semblent préférentiellement associés. Elle est notamment la deuxième lignée candidate d'archées la plus souvent détectée dans les sédiments dulçaquicoles, suggérant que ses représentants jouent un rôle important dans les processus benthiques à l'échelle globale. D'autre part, les membres de cette lignée sont présents de manière récurrente au sein des communautés d'archées associées aux processus d'OAM (cf. revue bibliographique) et pourraient donc être impliqués dans ce processus. Néanmoins cette lignée candidate domine également la communauté procaryote dans des sédiments hypersalins où l'oxydation anaérobie du méthane n'a jamais été mise en évidence (Jiang *et al.*, 2008; Swan *et al.*, 2010). Cette disparité de répartition entre "milieux avec OAM" et "milieux sans OAM" pourrait être liée à une méthanotrophie anaérobie facultative des MBG-D. Nous pouvons aussi faire l'hypothèse que la présence de MBG-D au niveau des zones d'OAM est favorisée par les déchets du métabolisme des organismes réalisant ce processus. La distribution des MBG-D dans les sédiments du Lac Pavin nous permet de proposer des hypothèses sur l'écophysiologie de ses représentants en se basant sur les changements verticaux généralement observés en milieux sédimentaire :

- i) une diminution de la disponibilité en substrat liée à la diminution combinée de la réactivité et du contenu en matière organique avec la profondeur (Burdige *et al.*, 2007)
- ii) un gradient vertical de diffusion de la matière organique labile dissoute issue de la dégradation de la matière organique fraîchement déposée en surface des sédiments (Schulz et Conrad, 1995; Schwarz *et al.*, 2008)
- iii) une modification de la composition des molécules organiques liée à la dégradation inégale des différents composants de la biomasse sédimentée et à l'accumulation de la biomasse microbienne formée dans le sédiment (Parkes *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 2001)

Ces changements verticaux impliquent à la fois une modification de la nature des substrats organiques disponibles et une augmentation du stress énergétique avec la profondeur. L'augmentation de l'abondance des MBG-D avec la profondeur suggère qu'ils sont capables de se développer et de se maintenir dans des conditions de stress énergétique plus importantes que les méthanogènes. Outre leur implication potentielle dans le processus d'OAM, les MBG-D pourraient utiliser des substrats alternatifs issus de la décomposition de la biomasse microbienne autochtone. Certains de ces composés pourraient être recyclés afin de diminuer les dépenses investies pour leur synthèse *de novo*. Cette stratégie a récemment été mise en évidence chez des archées se développant dans les sédiments marins, capables de recycler les chaînes isopréniques issues de lipides contenus dans la matière organique détritique, au lieu de synthétiser ces chaînes *de novo* (Takano *et al.*, 2010).

Au vu des observations réalisées dans le Lac Pavin et dans d'autres environnements, conduire des études ciblées sur cette lignée candidate apparaît être une perspective essentielle.

III- Diversité des virus benthiques et leur influence sur les communautés procaryotes

III.1. Une potentielle infection des méthanogènes et des archées par les virus dans les sédiments du Lac Pavin

L'étude conduite sur les particules virales, présentes le long d'une carotte de 40 cm de sédiment prélevée au Pavin, nous a permis de mettre en évidence une forte abondance de virus (y compris dans les sédiments les plus anciens, *ca.* 10^{10} particules g^{-1}), associée à une forte diversité morphologique comportant :

- i) des formes atypiques (citron, bâtonnet, filament, *etc.*) caractéristiques des virus d'archées rapportés dans des milieux hyperthermophiles et hyperhalophiles (Bath *et al.*, 2006; Prangishvili *et al.*, 2006)
- ii) des formes virales putatives qui, à notre connaissance, n'ont jamais été observées dans la nature (carrés et tores).
- iii) De plus nous avons pu observer, pour la première fois, des formes virales atypiques intracellulaires, résultant apparemment d'une prolifération virale dans le cytoplasme d'une cellule que nous avons identifiée, sur des bases morphologiques, comme une archée méthanogène putative.

Dans le cadre de nos travaux visant à appréhender et à modéliser le cycle biogéochimique du méthane dans les écosystèmes lacustres, la détermination de l'impact des virus sur la régulation des communautés méthanogènes et méthanotrophes représente une perspective majeure. L'activité des méthanogènes étant dépendante de l'activité des organismes fermentatifs syntrophes, il sera aussi nécessaire de prendre en compte l'impact des virus sur ces groupes fonctionnels. La mise en évidence de virus infectant spécifiquement des méthanogènes dans les sédiments lacustres constituerait une première étape pour appréhender leur impact sur le cycle du méthane. Plusieurs approches pourraient être développées afin de tester l'hypothèse d'une infection des archées méthanogènes (ou non méthanogènes) par les virus dans les sédiments du Pavin et d'étudier leur dynamique en relation avec celle de leur hôte :

- 1) Il serait essentiel d'isoler des couples virus-méthanogènes à partir des sédiments afin de clarifier la possible régulation des méthanogènes par les virus, de définir le type de cycle développé par ces virus et de déterminer s'ils appartiennent à une famille propre à la virosphère des *Archaea* ou aux virus icosaédriques. Afin d'augmenter les chances d'isoler des virus infectant les méthanogènes il sera préférable d'utiliser des souches de méthanogènes isolées du Pavin. Néanmoins, dans l'attente de l'isolement de souches de méthanogènes issues des groupes

dominants, il sera possible d'utiliser la souche 17A1^T, ainsi que des souches affiliées aux *Methanosaetaceae* et aux *Methanoregulaceae* disponibles dans des centres de ressources biologiques (par exemple la DSMZ). L'isolement de virus de méthanogènes donnera aussi accès à leur génome. Si des gènes spécifiques à ces génomes sont identifiés, il sera possible de les rechercher dans des banques métagénomiques construites à différentes dates. Il sera alors éventuellement possible d'appréhender la dynamique de prévalence de ces virus en relation avec les variations d'abondance et d'activité de leur hôte.

- 2) L'hybridation avec des sondes oligonucléotidiques magnétiques ciblant des groupes taxinomiques spécifiques (e.g. *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, et aussi les clades MBGD et MCG) pourra être réalisée par une approche de magnéto-FISH. Cette technique en cours de développement au LMGE (Equipe Microbiologie Environnementale et Bioinformatique), nous permettra de séparer les cellules archéennes ciblées de l'ensemble des cellules procaryotes, de les collecter et d'observer en microscopie électronique à transmission l'infection putative de ces cellules appartenant aux groupes ciblés.

III.2 Rôles potentiels des virus dans le fonctionnement de la communauté des sédiments

L'observation de cellules infectées, le changement vertical de la structure de la communauté virale, la présence de nombreux morphotypes non retrouvés dans la colonne d'eau et la corrélation des abondances virales et procaryotiques avec la profondeur témoignent d'une production virale autochtone, affectant donc les communautés microbiennes réparties sur l'ensemble de la couche sédimentaire étudiée. Cependant, l'impact des virus sur la communauté microbienne reste encore à clarifier. Il nous paraît envisageable que les virus jouent des rôles différents dans le fonctionnement de la communauté benthique en fonction des variations saisonnières d'apports en matière organique depuis le mixolimnion.

- En période de forte sédimentation, la communauté benthique des sédiments superficiels est potentiellement non limitée par la ressource et très active. Dans cette période les virus pourraient avoir un contrôle top-down fort sur la communauté procaryote qui permettrait de réguler, dans le temps, la période d'utilisation de la matière organique fraîchement sédimentée. Par ailleurs, ce type

de contrôle top-down par les virus en conditions non limitantes de substrat a été observé dans un sol arctique (Allen *et al.*, 2010).

- En hiver, lorsque la sédimentation de matière organique est peu importante les virus pourraient aider au maintien de l'activité de la communauté procaryote en facilitant le recyclage des nutriments au travers de la lyse cellulaire. Cette hypothèse a été proposée en milieu benthique marin profond où les apports de matière organique fraîche par la sédimentation sont très peu importants (Danovaro *et al.*, 2008).

IV- *Perspectives générales sur les communautés des sédiments du Lac Pavin*

Plusieurs perspectives concernant indépendamment les méthanogènes, les méthanotrophes ou les virus ont été proposées au cours de la discussion. Nous proposons ici deux perspectives de recherche sur les communautés d'archées et de virus des sédiments. Afin d'affiner nos connaissances sur les communautés impliquées dans le cycle du méthane, les lignées candidates d'archées et les virus dans les sédiments, il serait pertinent d'effectuer un suivi spatial et un suivi temporel.

Suivi spatial :

Il serait intéressant de répéter les études 2 et 4 de cette thèse au niveau des sédiments du mixolimnion et de la chémocline. En effet, ceci permettrait d'établir l'importance de la présence d'oxygène (métalimnion) et de fer ferrique (chemocline) sur la composition et la répartition verticale des communautés d'archées. En effectuant cette comparaison à partir des sédiments d'un même lac, il devrait être possible de s'affranchir d'une partie de la variabilité des conditions rencontrées d'un lac à l'autre (température, taux de sédimentation, composition spécifique du phytoplancton sédimentant, nature de la matrice minérale du sédiment...). Plus spécifiquement, cette comparaison permettrait d'évaluer :

- L'influence des concentrations en fer ferrique des sédiments sur la composition des méthanogènes. Est-ce que les *Methanosaeta* dominent sur les *Methanomicrobiales* dans les sédiments de la chemocline ?
- L'influence de conditions oxygénées à la surface des sédiments sur la présence des lignées candidates d'archées RC-V et LDS. En effet, ces lignées sont largement

rencontrées en milieu lacustre mais très minoritairement présentes voire absentes dans les sédiments du monimolimnion du Lac Pavin.

- Une possible généralisation de la succession verticale des méthanogènes et des MBG-D dans des conditions différentes.
- La présence de morphotypes de virus d'archées associés à des communautés différentes.
- L'intensité de l'activité lytique dans des sédiments où l'activité microbienne est favorisée par la présence d'oxygène ou de fer ferrique.

Suivi temporel :

En période de forte sédimentation, l'intense dégradation de la matière organique fraîche à la surface du sédiment engendre une augmentation de la concentration en composés organiques labiles dissous (acétate, propionate...) et leur diffusion en profondeur dans le sédiment (Schulz and Conrad, 1995; Schwarz *et al.*, 2008). L'étude de l'impact des variations temporelles de la diffusion de ces composés sur les lignées méthanogènes et les lignées candidates d'archées apporterait des informations essentielles sur leur écologie. En outre cela permettrait de tester les hypothèses concernant l'influence de la labilité de la matière organique dans la répartition de ces lignées. En plus des variations d'abondance il sera important de prendre en considération les variations d'activité de ces lignées en quantifiant les transcrits ARNr 16S. En effet, il est probable que leur activité soit beaucoup plus affectée par les changements de conditions que leur abondance. En parallèle, il sera nécessaire de mesurer les taux de sédimentation (trappes à sédiments) et la diffusion de certains composés organiques dans le sédiment par la méthode de King (1991). Cette méthode permet de mesurer des concentrations d'acétate, de propionate et d'autres composés organiques à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Enfin, il serait intéressant que cette étude intègre un suivi des variations temporelles de l'activité lytique et lysogénique pour les mêmes profondeurs échantillonnées. Ce suivi permettra notamment d'examiner :

- La possibilité d'une dynamique saisonnière de l'activité, voire de l'abondance, des méthanogènes et des lignées candidates d'archées dans le sédiment. Est-ce que les lignées candidates sont affectées de la même manière que les méthanogènes par l'apport de matière organique en surface du sédiment ? Est-ce que les lignées de méthanogènes dominantes et minoritaires sont affectées de la même manière ?

- La limite à laquelle ces différentes lignées semblent influencées par la diffusion de ces composés dissous.
- La réponse des lignées candidates en fonction de leur localisation sur les gradients de diffusion de ces composés, et en période de faible apport de matière organique fraîche.
- Les changements de stratégies virales en fonction des apports de matière organique fraîche.

REFERENCES

- Abril, G., and Iversen, N. (2002) Methane dynamics in a shallow non-tidal estuary (Randers Fjord, Denmark). *Mar Ecol Prog Ser* **230**: 171-181.
- Achtnich, C., Bak, F., and Conrad, R. (1995) Competition for electron donors among nitrate reducers, ferric iron reducers, sulfate reducers, and methanogens in anoxic paddy soil. *Biol Fertil Soils* **19**: 65-72.
- Ackermann, H.W., and DuBow, M.S. (1987) *Viruses of prokaryotes: general properties of bacteriophages*. Boca Raton: CRC Press.
- Aeschbach-Hertig, W., Hofer, M., Kipfer, R., Imboden, D.M., and Wieler, R. (1999) Accumulation of mantle gases in a permanently stratified volcanic lake (Lac Pavin, France). *Geochim Cosmochim Acta* **63**: 3357-3372.
- Aeschbach-Hertig, W., Hofer, M., Schmid, M., Kipfer, R., and Imboden, D.M. (2002) The physical structure and dynamics of a deep, meromictic crater lake (Lac Pavin, France). *Hydrobiologia* **487**: 111-136.
- Allen, B., Willner, D., Oechel, W.C., and Lipson, D. (2010) Top down control of microbial activity and biomass in an Arctic soil ecosystem. *Environ Microbiol* **12**: 642-648.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Amaral, J.A., and Knowles, R. (1995) Growth of methanotrophs in methane and oxygen counter gradients. *FEMS Microbiol Lett* **126**: 215-220.
- Amblard, C. (1983) Intérêts du dosage de l'ensemble des nucléotides adényliques pour l'estimation de la biomasse des populations phytoplanctoniques lacustres (Lac Pavin, France). *J Plankton Res* **5**: 723-738.
- Amblard, C., Rachiq, S., and Bourdier, G. (1992) Photolithotrophy, photoheterotrophy and chemoheterotrophy during spring phytoplankton development (Lake Pavin). *Microb Ecol* **24**: 109-123.
- Amblard, C., Boisson, J., Bourdier, G., Fontvieille, D., Gayte, X., and Sime-Ngando, T. (1998) Ecologie microbienne en milieu aquatique: des virus aux protozoaires. *Revue des sciences de l'eau, numéro spécial* **11**: 145-162.
- Anderson, B., Bartlett, K., Froking, S., Hayhoe, K., Jenkins, J., and Salas, W. (2009) Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. In: EPA (United States Environmental Protection Agency).
- Arnold, H.P., Ziese, U., and Zillig, W. (2000) SNDV, a novel virus of the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus*. *Virology* **272**: 409-416.
- Arnous, M.-B., Courcol, N., and Carrias, J.-F. (2010) The significance of transparent exopolymeric particles in the vertical distribution of bacteria and heterotrophic nanoflagellates in Lake Pavin. *Aquat Sci* **72**: 245-253.
- Assayag, N., Jézéquel, D., Ader, M., Viollier, E., Michard, G., Prévot, F., and Agrinier, P. (2008) Hydrological budget, carbon sources and biogeochemical processes in Lac Pavin (France): Constraints from $\delta^{18}\text{O}$ of water and $\delta^{13}\text{C}$ of dissolved inorganic carbon. *Appl Geochem* **23**: 2800-2816.
- Auguet, J.-C., Nomokonova, N., Camarero, L., and Casamayor, E.O. (2011) Seasonal changes of freshwater ammonia-oxidizing archaeal assemblages and nitrogen species in oligotrophic alpine lakes. *Appl Environ Microbiol* **77**: 1937-1945.
- Auguet, J.C., and Casamayor, E.O. (2008) A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environ Microbiol* **10**: 1080-1086.
- Auguet, J.C., Barberan, A., and Casamayor, E.O. (2010) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J* **4**: 182-190.

REFERENCES

- Auman, A.J., Stolyar, S., Costello, A.M., and Lidstrom, M.E. (2000) Molecular characterization of methanotrophic isolates from freshwater lake sediment. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5259-5266.
- Bapteste, E., Brochier, C., and Boucher, Y. (2005) Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* **1**: 353-363.
- Barberán, A., Fernández-Guerra, A., Auguet, J.-C., Galand, P.E., and Casamayor, E.O. (2011) Phylogenetic ecology of widespread uncultured clades of the Kingdom Euryarchaeota. *Mol Ecol* **20**: 1988-1996.
- Barnes, R.O., and Goldberg, E.D. (1976) Methane production and consumption in anoxic marine-sediments. *Geology* **4**: 297-300.
- Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W., and Pace, N.R. (1994) Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 1609-1613.
- Barns, S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D., and Pace, N.R. (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9188-9193.
- Barry, E.R., and Bell, S.D. (2006) DNA replication in the archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 876-887.
- Bastviken, D. (2009) Methane. In *Encyclopedia of Inland Waters*. Likens, G.E. (ed): Elsevier, pp. 783-805.
- Bastviken, D., Ejlertsson, J., and Tranvik, L. (2002) Measurement of methane oxidation in lakes: A comparison of methods. *Environ Sci Technol* **36**: 3354-3361.
- Bastviken, D., Ejlertsson, J., Sundh, I., and Tranvik, L. (2003) Methane as a source of carbon and energy for lake pelagic food webs. *Ecology* **84**: 969-981.
- Bastviken, D., Cole, J., Pace, M., and Tranvik, L. (2004) Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochem Cycles* **18**: doi:10.1029/2004GB002238.
- Bastviken, D., Cole, J.J., Pace, M.L., and Van de Bogert, M.C. (2008) Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄ emissions. *J Geophys Res* **113**: G02024, doi:02010.01029/02007JG000608.
- Bastviken, D., Tranvik, L.J., Downing, J.A., Crill, P.M., and Enrich-Prast, A. (2011) Freshwater methane emissions offset the continental carbon sink. *Science* **331**: 50.
- Bastviken, D., Santoro, A.L., Marotta, H., Pinho, L.Q., Calheiros, D.F., Crill, P., and Enrich-Prast, A. (2010) Methane emissions from Pantanal, South America, during the low water season: toward more comprehensive sampling. *Environ Sci Technol* **44**: 5450-5455.
- Bath, C., and Dyll-Smith, M.L. (1998) His1, an archaeal virus of the Fuselloviridae family that infects Haloarcula hispanica. *J Virol* **72**: 9392-9395.
- Bath, C., Cukalac, T., Porter, K., and Dyll-Smith, M.L. (2006) His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus. *Virology* **350**: 228-239.
- Battison, I., Pesce, S., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., and Bohatier, J. (2007) Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. *Microb Ecol* **54**: 761-770.
- Beal, E.J., House, C.H., and Orphan, V.J. (2009) Manganese- and Iron-Dependent Marine Methane Oxidation. *Science* **325**: 184-187.
- Bedard, C., and Knowles, R. (1989) Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev* **53**: 68-84.
- Bédard, C., and Knowles, R. (1991) Hypolimnetic O₂ consumption, denitrification, and methanogenesis in a thermally stratified lake. *Can J Fish Aquat Sci* **48**: 1048-1054.

- Beerling, D.J., Gardiner, T., Leggett, G., Mcleod, A., and Quick, W. (2008) Missing methane emissions from leaves of terrestrial plants. *Global Change Biol* **14**: 1821-1826.
- Belova, S.E., Baani, M., Suzina, N.E., Bodelier, P.L.E., Liesack, W., and Dedysh, S.N. (2011) Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp. *Environ Microbiol Rep* **3**: 36-46.
- Bender, M., and Conrad, R. (1994) Methane oxidation activity in various soils and fresh-water sediments - occurrence, characteristics, vertical profiles, and distribution on grain-size fractions. *J Geophys Res D: Atmos* **99**: 16531-16540.
- Berdjeb, L., and Jacquet, S. (2009) La virosphère: quelle place dans le fonctionnement et l'évolution des écosystèmes aquatiques (partie 2)? *Virologie* **13**: 189-199.
- Bergh, Ø., Børshheim, K.Y., Bratbak, G., and Heldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468.
- Bertani, G., and Baresi, L. (1986) Looking for gene transfer mechanisms in methanogenic bacteria. *Archaeobacteria* **85**: 398.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., and Dolan, J. (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2941-2951.
- Bettarel, Y., Bouvy, M., Dumont, C., and Sime-Ngando, T. (2006) Virus-bacterium interactions in water and sediment of West African inland aquatic systems. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5274-5282.
- Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., Amblard, C., Carrias, J.F., Sargos, D., Garabetian, F., and Lavandier, P. (2002) The functional importance of bacteriophages in the microbial loop of an oligomesotrophic lake over a diel cycle. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology* **38**: 263-269.
- Bettarel, Y., Bouvier, T., Bouvier, C., Carré, C., Desnues, A., Domaizon, I., Jacquet, S., Robin, A., and Sime Ngando, T. (2011) Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full salinity gradient. *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 360-372.
- Bettstetter, M., Peng, X., Garrett, R.A., and Prangishvili, D. (2003) AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. *Virology* **315**: 68-79.
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R., Fredricks, H.F., Elvert, M., Kelly, T.J. et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3846-3851.
- Bidierre-Petit, C., Boucher, D., Kuever, J., Alberic, P., Jézéquel, D., Chebance, B., Borrel, G., Fonty, G., and Peyret, P. (2010) Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (Lake Pavin) using *aprA* and 16S rRNA gene markers. *Microb Ecol* **61**: 1-15.
- Bidierre-Petit, C., Jézéquel, D., Dugat-Bony, E., Lopes, F., Kuever, J., Borrel, G., Viollier, E., Fonty, G., and Peyret, P. (2011) Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 533-545.
- Binder, B. (1999) Reconsidering the relationship between virally induced bacterial mortality and frequency of infected cells. *Aquat Microb Ecol* **18**: 207-215.
- Bodelier, P.L.E., and Laanbroek, H.J. (2004) Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 265-277.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B.B., Witte, U. et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Bonin, A.S., and Boone, D. (2006) The Order Methanobacteriales. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Bonin, A., and

- Boone, D. (eds): Springer New York, pp. 231-243.
- Borin, S., Brusetti, L., Mapelli, F., D'Auria, G., Brusa, T., Marzorati, M., Rizzi, A., Yakimov, M., Marty, D. et al. (2009) Sulfur cycling and methanogenesis primarily drive microbial colonization of the highly sulfidic Urania deep hypersaline basin. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9151-9156.
- Borjesson, G., Sundh, I., and Svensson, B. (2004) Microbial oxidation of CH₄ at different temperatures in landfill cover soils. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 305-312.
- Borrel, G., Lehours, A.C., Bardot, C., Bailly, X., and Fonty, G. (2010) Members of candidate divisions OP11, OD1 and SR1 are widespread along the water column of the meromictic Lake Pavin (France). *Arch Microbiol* **192**: 559-567.
- Borrel, G., Joblin, K., Guedon, A., Colombet, J., Tardy, V., Lehours, A.C., and Fonty, G. (in press) *Methanobacterium lacus* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the deep cold sediment of a meromictic lake. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.-P., Peyret, P., Fonty, G., and Lehours, A.-C. (2011) Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Res Microbiol* **162**: 832-847.
- Bosse, U., Frenzel, P., and Conrad, R. (1993) Inhibition of methane oxidation by ammonium in the surface layer of a littoral sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **13**: 123-134.
- Boucher, D., Jardillier, L., and Debroas, D. (2006) Succession of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 79-97.
- Bourne, D.G., McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (2001) Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3802-3809.
- Bräuer, S.L., Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J.B., and Zinder, S.H. (2006) Isolation of a novel acidiphilic methanogen from an acidic peat bog. *Nature* **442**: 192-194.
- Breitbart, M., and Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* **13**: 278-284.
- Breitbart, M., Wegley, L., Leeds, S., Schoenfeld, T., and Rohwer, F. (2004a) Phage community dynamics in hot springs. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1633-1640.
- Breitbart, M., Felts, B., Kelley, S., Mahaffy, J.M., Nulton, J., Salamon, P., and Rohwer, F. (2004b) Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc R Soc London, Ser B* **271**: 565-574.
- Brie, C., Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (2007) Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Res Microbiol* **158**: 213-227.
- Brochier-Armanet, C., Forterre, P., and Gribaldo, S. (2011) Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol* **14**: 274-281.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* **6**: 245-252.
- Brochier, C., Gribaldo, S., Zivanovic, Y., Confalonieri, F., and Forterre, P. (2005) Nanoarchaea: representatives of a novel archaeal phylum or a fast-evolving euryarchaeal lineage related to Thermococcales? *Genome Biol* **6**: R42 (doi:10.1186/gb-2005-1186-1185-r1142).
- Brussaard, C.P.D. (2004) Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1506-1513.
- Buckley, D.R., Rockne, K.J., Li, A., and Mills, W.J. (2004) Soot deposition in the Great Lakes: Implications for semi-volatile hydrophobic

- organic pollutant deposition. *Environ Sci Technol* **38**: 1732-1739.
- Burdige, D.J. (2007) Preservation of organic matter in marine sediments: controls, mechanisms, and an imbalance in sediment organic carbon budgets? *Chem Rev* **107**: 467-485.
- Bussmann, I., Rahalkar, M., and Schink, B. (2006) Cultivation of methanotrophic bacteria in opposing gradients of methane and oxygen. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 331-344.
- Bussmann, I., Pester, M., Brune, A., and Schink, B. (2004) Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 179-189.
- Cadillo-Quiroz, H., Yashiro, E., Yavitt, J.B., and Zinder, S.H. (2008) Characterization of the archaeal community in a minerotrophic fen and terminal restriction fragment length polymorphism-directed isolation of a novel hydrogenotrophic methanogen. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2059-2068.
- Cadillo-Quiroz, H., Brauer, S., Yashiro, E., Sun, C., Yavitt, J., and Zinder, S. (2006) Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environ Microbiol* **8**: 1428-1440.
- Callieri, C., Bertoni, R., Corno, G., Caravati, E., Rasconi, S., and Contesini, M. (2009) Bacteria, Archaea and Crenarchaeota in the epilimnion and hypolimnion of a deep holo-oligomictic lake. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7298-7300
- Canfield, D.E. (2005) The Methane Cycle. *Adv Mar Biol* **48**: 383-418.
- Capone, D.G., and Kiene, R.P. (1988) Comparison of microbial dynamics in marine and freshwater sediments - contrasts in anaerobic carbon catabolism. *Limnol Oceanogr* **33**: 725-749.
- Casamayor, E., and Borrego, C. (2009) Archaea. *Encyclopedia of inland waters* **3**: 167-181.
- Castro, H., Ogram, A., and Reddy, K.R. (2004) Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6559-6568.
- Cavalier-Smith, T. (2006) Rooting the tree of life by transition analyses. *Biol Direct* **1**: 19.
- Cavicchioli, R. (2010) Archaea—timeline of the third domain. *Nat Rev Microbiol* **9**: 51-61.
- Champiat, D. (1976) Applications du dosage des adenosines 5-phosphate a l'etude de la microflore du lac Pavin . In. Clermont-Ferrand: Université de Clermont, p. 107.
- Chan, O.C., Wolf, M., Hepperle, D., and Casper, P. (2002) Methanogenic archaeal community in the sediment of an artificially partitioned acidic bog lake. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 119-129.
- Chan, O.C., Claus, P., Casper, P., Ulrich, A., Lueders, T., and Conrad, R. (2005) Vertical distribution of structure and function of the methanogenic archaeal community in Lake Dagow sediment. *Environ Microbiol* **7**: 1139-1149.
- Chapron, E., Albéric, P., Jézéquel, D., Versteeg, W., Bourdier, J.L., and Sitbon, J. (2010) Multidisciplinary characterisation of sedimentary processes in a recent maar lake (Lake Pavin, French Massif Central) and implication for natural hazards. *Nat Hazards Earth Syst Sci* **10**: 1815-1827.
- Chavant, P., Taupin, V., El Alaoui, H., Wawrzyniak, I., Chambon, C., Prensier, G., Méténier, G., and Vivarès, C.P. (2005) Proteolytic activity in Encephalitozoon cuniculi sporogonial stages: Predominance of metallopeptidases including an aminopeptidase-P-like enzyme. *Int J Parasitol* **35**: 1425-1433.
- Chin, K.J., and Conrad, R. (1995) Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature. *FEMS Microbiol Ecol* **18**: 85-102.
- Cicerone, R.J., and Oremland, R.S. (1988) Biogeochemical aspects of atmospheric

- methane. *Global Biogeochem Cycles* **2**: 299-327.
- Clarke, K., and Warwick, R.M. (2001) *Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation (PRIMER-E)*. Plymouth: Plymouth Marine Laboratory.
- Cole, J., Chai, B., Farris, R., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A., McGarrell, D., Bandela, A., Cardenas, E., Garrity, G. et al. (2006) The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* **35**: 169–172.
- Cole, J., Prairie, Y., Caraco, N., McDowell, W., Tranvik, L., Striegl, R., Duarte, C., Kortelainen, P., Downing, J. et al. (2007) Plumbing the global carbon cycle: integrating inland waters into the terrestrial carbon budget. *Ecosystems* **10**: 172-185.
- Colombet, J. (2008) Vertical variability in a deep meromictic lake: diversity and lysogenic activity of viral communities. In *Laboratoire Microorganismes: Genome et Environnement*. Aubière: Université Blaise Pascal.
- Colombet, J., Sime-Ngando, T., Cauchie, H.M., Fonty, G., Hoffmann, L., and Demeure, G. (2006) Depth-related gradients of viral activity in Lake Pavin. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4440-4445.
- Colombet, J., Robin, A., Lavie, L., Bettarel, Y., Cauchie, H.M., and Sime-Ngando, T. (2007) Virioplankton 'pegylation': Use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *J Microbiol Methods* **71**: 212-219.
- Colombet, J., Charpin, M., Robin, A., Portelli, C., Amblard, C., Cauchie, H.M., and Sime-Ngando, T. (2009) Seasonal depth-related gradients in virioplankton: standing stock and relationships with microbial communities in Lake Pavin (France). *Microb Ecol* **58**: 728-736.
- Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **28**: 193-202.
- Conrad, R. (2007) Microbial ecology of methanogens and methanotrophs. *Adv Agron* **96**: 1-63.
- Conrad, R. (2009) The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep* **1**: 285-292.
- Conrad, R., Erkel, C., and Liesack, W. (2006) Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 262-267.
- Conrad, R., Chan, O.C., Claus, P., and Casper, P. (2007) Characterization of methanogenic Archaea and stable isotope fractionation during methane production in the profundal sediment of an oligotrophic lake (Lake Stechlin, Germany). *Limnol Oceanogr* **52**: 1393-1406.
- Conrad, R., Klose, M., Claus, P., and Enrich-Prast, A. (2010) Methanogenic pathway, C-13 isotope fractionation, and archaeal community composition in the sediment of two clear-water lakes of Amazonia. *Limnol Oceanogr* **55**: 689-702.
- Conrad, R., Klose, M., Noll, M., Kemnitz, D., and Bodelier, P.L.E. (2008) Soil type links microbial colonization of rice roots to methane emission. *Global Change Biol* **14**: 657-669.
- Coolen, M.J.L., and Overmann, J. (2007) 217 000-year-old DNA sequences of green sulfur bacteria in Mediterranean sapropels and their implications for the reconstruction of the paleoenvironment. *Environ Microbiol* **9**: 238-249.
- Coolen, M.J.L., Hopmans, E.C., Rijpstra, W.I.C., Muyzer, G., Schouten, S., Volkman, J.K., and Sinninghe Damste, J.S. (2004) Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Org Geochem* **35**: 1151-1167.
- Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., and Danovaro, R. (2007) Viral infection plays a key role in

- extracellular DNA dynamics in marine anoxic systems. *Limnol Oceanogr* **52**: 508-516.
- Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Magagnini, M., and Danovaro, R. (2010) Viral decay and viral production rates in continental shelf and deep sea sediments of the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 208-218.
- Costello, A.M., and Lidstrom, M.E. (1999) Molecular characterization of functional and phylogenetic genes from natural populations of methanotrophs in lake sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 5066-5074.
- Costello, A.M., Auman, A.J., Macalady, J.L., Scow, K.M., and Lidstrom, M.E. (2002) Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. *Environ Microbiol* **4**: 443-450.
- Crowe, S.A., Katsev, S., Leslie, K., Sturm, A., Magen, C., Nomosatryo, S., Pack, M.A., Kessler, J.D., Reeburgh, W.S. et al. (2010) The methane cycle in ferruginous Lake Matano. *Geobiol* **9**: 61-78.
- d'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad Sci Paris* **165**: 373-375.
- Danovaro, R., Dell'anno, A., Pusceddu, A., and Fabiano, M. (1999) Nucleic acid concentrations (DNA, RNA) in the continental and deep-sea sediments of the eastern Mediterranean: relationships with seasonally varying organic inputs and bacterial dynamics. *Deep Sea Res Part I* **46**: 1077-1094.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M., and Vanucci, S. (2001) Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1384-1387.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Magagnini, M., Noble, R., Tamburini, C., and Weinbauer, M. (2008a) Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature* **454**: 1084-1087.
- Danovaro, R., Corinaldesi, C., Filippini, M., Fischer, U.R., Gessner, M.O., Jacquet, S., Magagnini, M., and Velimirov, B. (2008b) Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review. *Freshw Biol* **53**: 1186-1213.
- Davey, M.E., and O'Toole, G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 847-867.
- Davis, J.P., Youssef, N.H., and Elshahed, M.S. (2009) Assessment of the diversity, abundance, and ecological distribution of members of candidate division SR1 reveals a high level of phylogenetic diversity but limited morphotypic diversity. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4139-4148.
- De Rosa, M., Gambacorta, A., and Gliozzi, A. (1986) Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol Mol Biol Rev* **50**: 70.
- Dean, W.E., and Gorham, E. (1998) Magnitude and significance of carbon burial in lakes, reservoirs, and peatlands. *Geology* **26**: 535-538.
- Dedysh, S.N., Knief, C., and Dunfield, P.F. (2005) Methylocella species are facultatively methanotrophic. *J Bacteriol* **187**: 4665-4670.
- Dedysh, S.N., Liesack, W., Khmelenina, V.N., Suzina, N.E., Trotsenko, Y.A., Semrau, J.D., Bares, A.M., Panikov, N.S., and Tiedje, J.M. (2000) Methylocella palustris gen. nov., sp nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 955-969.
- Dedysh, S.N., Belova, S.E., Bodelier, P.L.E., Smirnova, K.V., Khmelenina, V.N., Chidthaisong, A., Trotsenko, Y.A., Liesack, W., and Dunfield, P.F. (2007) Methylocystis heyeri sp. nov., a novel type II methanotrophic bacterium possessing 'signature' fatty acids of type I methanotrophs. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 472-479.
- Deines, P., Grey, J., Richnow, H.H., and Eller, G. (2007) Linking larval chironomids to methane: seasonal variation of the microbial methane cycle and chironomid delta C-13. *Aquat Microb Ecol* **46**: 273-282.

- Dekas, A.E., Poretsky, R.S., and Orphan, V.J. (2009) Deep-sea archaea fix and share nitrogen in methane-consuming microbial consortia. *Science* **326**: 422-426.
- DeLong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5685-5689.
- DeLong, E.F., and Pace, N.R. (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* **50**: 470-478.
- Demuth, J., Neve, H., and Witzel, K.P. (1993) Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in Lake Plu {beta} see. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3378-3384.
- DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P. et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5069-5072.
- Deutzmann, J.S., and Schink, B. (2011) Anaerobic oxidation of methane in sediments of Lake Constance, an oligotrophic freshwater lake. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4429-4436.
- Dlugokencky, E., Bruhwiler, L., White, J., Emmons, L., Novelli, P., Montzka, S., Masarie, K., Lang, P., Crotwell, A. et al. (2009) Observational constraints on recent increases in the atmospheric CH₄ burden. *Geophys Res Lett* **36**: doi:10.1029/2009GL039780.
- Downing, J.A., Prairie, Y.T., Cole, J.J., Duarte, C.M., Tranvik, L.J., Striegl, R.G., McDowell, W.H., Kortelainen, P., Caraco, N.F. et al. (2006) The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnol Oceanogr* **51**: 2388-2397.
- Duc, N.T., Crill, P., and Bastviken, D. (2010) Implications of temperature and sediment characteristics on methane formation and oxidation in lake sediments. *Biogeochemistry* **100**: 185-196.
- Dueck, T.A., De Visser, R., Poorter, H., Persijn, S., Gorissen, A., De Visser, W., Schapendonk, A., Verhagen, J., Snel, J. et al. (2007) No evidence for substantial aerobic methane emission by terrestrial plants: a ¹³C labelling approach. *New Phytol* **175**: 29-35.
- Duhamel, S., and Jacquet, S. (2006) Flow cytometric analysis of bacteria-and virus-like particles in lake sediments. *J Microbiol Methods* **64**: 316-332.
- Dumestre, J.-F., Casamayor, E.O., Massana, R., and Pedrós-Alió, C. (2002) Changes in bacterial and archaeal assemblages in an equatorial river induced by the water eutrophication of Petit Saut dam reservoir (French Guiana). *Aquat Microb Ecol* **26**: 209-221.
- Dumont, M.G., Pommerenke, B., Casper, P., and Conrad, R. (2011) DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. *Environ Microbiol*: 1153-1167.
- Dunfield, P.F., Belova, S.E., Vorob'ev, A.V., Cornish, S.L., and Dedysh, S.N. (2010) *Methylocapsa aurea* sp. nov., a facultative methanotroph possessing a particulate methane monooxygenase, and emended description of the genus *Methylocapsa*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 2659-2664.
- Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S.B., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z.M. et al. (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature* **450**: 879-882.
- Earl, J., Hall, G., Pickup, R., Ritchie, D., and Edwards, C. (2003) Analysis of methanogen diversity in a hypereutrophic lake using PCR-RFLP analysis of mcr sequences. *Microb Ecol* **46**: 270-278.
- Edlin, G., Lin, L., and Kudrna, R. (1975) Lysogens of *E. coli* reproduce more rapidly than non-lysogens. *Nature* **255**: 735-737.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V. et al. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the

- evolution of the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8102-8107.
- Eller, G., Kanel, L.K., and Kruger, M. (2005) Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of lake Plußsee. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8925-8928.
- Elvert, M., Suess, E., and Whiticar, M.J. (1999) Anaerobic methane oxidation associated with marine gas hydrates: superlight C-isotopes from saturated and unsaturated C-20 and C-25 irregular isoprenoids. *Naturwissenschaften* **86**: 295-300.
- Ermiler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M., and Thauer, R.K. (1997) Crystal structure of methyl coenzyme M reductase: The key enzyme of biological methane formation. *Science* **278**: 1457-1462.
- Ettwig, K.F., van Alen, T., van de Pas-Schoonen, K.T., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2009) Enrichment and molecular detection of denitrifying methanotrophic bacteria of the NC10 phylum. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3656-3662.
- Ettwig, K.F., Shima, S., van de Pas-Schoonen, K.T., Kahnt, J., Medema, M.H., op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2008) Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environ Microbiol* **10**: 3164-3173.
- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J. et al. (2010) Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**: 543-548.
- Evans, P.N., Hinds, L.A., Sly, L.I., McSweeney, C.S., Morrison, M., and Wright, A.D.G. (2009) Community composition and density of methanogens in the foregut of the Tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Appl Environ Microbiol* **75**: 2598-2602.
- Fallon, R., Harrits, S., Hanson, R., and Brock, T. (1980) The role of methane in internal carbon cycling in Lake Mendota during summer stratification. *Limnol Oceanogr* **25**: 357-360.
- Falz, K.Z., Holliger, C., Grosskopf, R., Liesack, W., Nozhevnikova, A.N., Muller, B., Wehrli, B., and Hahn, D. (1999) Vertical distribution of methanogens in the anoxic sediment of Rotsee (Switzerland). *Appl Environ Microbiol* **65**: 2402-2408.
- Fauquet, C. (2005) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*: Academic Press.
- Fenchel, T., and Blackburn, T.H. (1979) *Bacteria and mineral cycling*. London: Academic Press.
- Filippini, M., and Middelboe, M. (2007) Viral abundance and genome size distribution in the sediment and water column of marine and freshwater ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 397-410.
- Filippini, M., Buesing, N., Bettarel, Y., Sime- Ngando, T., and Gessner, M.O. (2006) Infection paradox: high abundance but low impact of freshwater benthic viruses. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4893-4898.
- Fischer, U.R., Weisz, W., Wieltschnig, C., Kirschner, A.K.T., and Velimirov, B. (2004) Benthic and pelagic viral decay experiments: a model-based analysis and its applicability. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6706-6713.
- Folland, C., Karl, T., Christy, R., Clarke, R., Gruza, G., Jouzel, J., Mann, M., Oerlemans, J., Salinger, M. et al. (2001) Climate change 2001: the scientific basis. In *Contribution of Working Group I to the IPCC Third Assessment Report* Press, C.U. (ed). Cambridge, pp. 99-181.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Bernsten, T., Betts, R., Fahey, D.W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D.C. et al. (2007) *Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Forterre, P. (2006a) The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res* **117**: 5-16.

- Forterre, P. (2006b) Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3669-3674
- Fox, G.E., Magrum, L.J., Balch, W.E., Wolfe, R.S., and Woese, C.R. (1977) Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 4537-4541.
- Frenzel, P., Thebrath, B., and Conrad, R. (1990) Oxidation of methane in the oxic surface layer of a deep lake sediment (Lake Constance). *FEMS Microbiol Lett* **73**: 149-158.
- Fuhrman, J., and Suttle, C. (1993) Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography* **6**: 51-63.
- Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399**: 541-548.
- Galand, P., Fritze, H., Conrad, R., and Yrjala, K. (2005) Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2195-2198.
- Galand, P.E., Fritze, H., and Yrjälä, K. (2003) Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. *Environ Microbiol* **5**: 1133-1143.
- Galand, P.E., Saarnio, S., Fritze, H., and Yrjala, K. (2002) Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiol Ecol* **42**: 441-449.
- Gantner, S., Andersson, A.F., Alonso-S ez, L., and Bertilsson, S. (2011) Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. *J Microbiol Methods* **84**: 12-18.
- Garcia, J.-L., Ollivier, B., and Whitman, W. (2006) The Order Methanomicrobiales. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Garcia, J.-L. et al. (eds): Springer New York, pp. 208-230.
- Garcia, J.L., Patel, B.K.C., and Ollivier, B. (2000) Taxonomic phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**: 205-226.
- Garoff, H., Hewson, R., and Opstelten, D.-J.E. (1998) Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1171-1190.
- Gebert, J., Groengroeft, A., and Miehlich, G. (2003) Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Manag* **23**: 609-619.
- Glissmann, K., Chin, K.J., Casper, P., and Conrad, R. (2004) Methanogenic pathway and archaeal community structure in the sediment of eutrophic Lake Dagow: Effect of temperature. *Microb Ecol* **48**: 389-399.
- Glud, R.N., and Middelboe, M. (2004) Virus and bacteria dynamics of a coastal sediment: implication for benthic carbon cycling. *Limnol Oceanogr* **49**: 2073-2081.
- Goevert, D., and Conrad, R. (2008) Carbon isotope fractionation by sulfate-reducing bacteria using different pathways for the oxidation of acetate. *Environ Sci Technol* **42**: 7813-7817.
- Gribaldo, S., and Brochier-Armanet, C. (2006) The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos Trans R Soc London, Ser B* **361**: 1007-1022.
- Grossart, H.P., Frindte, K., Dziallas, C., Eckert, W., and Tang, K.W. (2011) Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 19657-19661.
- Grosskopf, R., Stubner, S., and Liesack, W. (1998) Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4983-4989.
- Guimbaud, C., Catoire, V., Gogo, S., Robert, C., Chartier, M., Laggoun-Défarge, F., Grossel, A., Albéric, P., Pomathiod, L. et al. (2011) A portable infrared laser spectrometer for flux measurements of trace gases at the

- p>geosphere–atmosphere interface.
- Measurement Science and Technology*
- 22**
- : doi:10.1088/0957-0233/1022/1087/075601.
- Guixa-Boixareu, N., Calderón-Paz, J., Haldal, M., Bratbak, G., and Pedrós-Alió, C. (1996) Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. *Aquat Microb Ecol* **11**: 215-227.
- Gunsalus, R.P., Romesser, J.A., and Wolfe, R.S. (1978) Preparation of coenzyme M analogs and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* **17**: 2374-2377.
- Gupta, R.S. (1998) Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1435-1491.
- Haglund, A.L., Törnblom, E., Boström, B., and Tranvik, L. (2002) Large differences in the fraction of active bacteria in plankton, sediments, and biofilm. *Microb Ecol* **43**: 232-241.
- Hallam, S.J., Girguis, P.R., Preston, C.M., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2003) Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5483-5491.
- Hallam, S.J., Putnam, N., Preston, C.M., Detter, J.C., Rokhsar, D., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2004) Reverse methanogenesis: Testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**: 1457-1462.
- Haller, L., Tonolla, M., Zopfi, J., Peduzzi, R., Wildi, W., and Pote, J. (2010) Composition of bacterial and archaeal communities in freshwater sediments with different contamination levels (Lake Geneva, Switzerland). *Water Res* **45**: 1213-1228.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontol Electron* **4**: 1-9.
- Hansen, J.W., Thamdrup, B., and Jørgensen, B.B. (2000) Anoxic incubation of sediment in gas-tight plastic bags: A method for biogeochemical process studies. *Mar Ecol Prog Ser* **208**: 273-282.
- Hanson, R.S., and Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* **60**: 439-471.
- Haring, M., Peng, X., Brugger, K., Rachel, R., Stetter, K.O., Garrett, R.A., and Prangishvili, D. (2004) Morphology and genome organization of the virus PSV of the hyperthermophilic archaeal genera *Pyrobaculum* and *Thermoproteus*: a novel virus family, the Globuloviridae. *Virology* **323**: 233-242.
- Häring, M., Rachel, R., Peng, X., Garrett, R.A., and Prangishvili, D. (2005a) Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, *Acidianus* bottle-shaped virus, from a new family, the Ampullaviridae. *J Virol* **79**: 9904-9911.
- Häring, M., Vestergaard, G., Rachel, R., Chen, L., Garrett, R.A., and Prangishvili, D. (2005b) Independent virus development outside a host. *Nature* **436**: 1101-1102.
- Harrison, B.K., Zhang, H., Berelson, W., and Orphan, V.J. (2009) Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* **75**: 1487-1499.
- Hedderich, R., and Whitman, W. (2006) Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. In *Prokaryotes*. Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., and Dworkin, M. (eds), pp. 1050-1079.
- Helton, R.R., and Wommack, K.E. (2009) Seasonal dynamics and metagenomic characterization of estuarine virobenthos assemblages by randomly amplified

- p polymorphic DNA PCR.
- Appl Environ Microbiol*
- 75**
- : 2259-2265.
- Henckel, T., Roslev, P., and Conrad, R. (2000) Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environ Microbiol* **2**: 666-679.
- Hessen, D., and Nygaard, K. (1992) Bacterial transfer of methane and detritus; implications for the pelagic carbon budget and gaseous release. *Arch Hydrobiol* **37**: 139-148.
- Hewson, I., and Fuhrman, J.A. (2003) Viriobenthos production and virioplankton sorptive scavenging by suspended sediment particles in coastal and pelagic waters. *Microb Ecol* **46**: 337-347.
- Heyer, J., Galchenko, V.F., and Dunfield, P.F. (2002) Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* **148**: 2831-2846.
- Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., and Moffett, B.F. (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 1-11.
- Hinrichs, K.U., Hayes, J.M., Sylva, S.P., Brewer, P.G., and DeLong, E.F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* **398**: 802-805.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S. (1994) Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediment - evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium. *Global Biogeochem Cycles* **8**: 451-463.
- Hoehler, T.M., Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S. (2001) Apparent minimum free energy requirements for methanogenic Archaea and sulfate-reducing bacteria in an anoxic marine sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **38**: 33-41.
- Hofer, J.S., and Sommaruga, R. (2001) Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms. *Aquat Microb Ecol* **26**: 1-11.
- Hong, S.H., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., and Epstein, S.S. (2009) Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J* **3**: 1365-1373.
- Hu, S., Zeng, R.J., Burow, L.C., Lant, P., Keller, J., and Yuan, Z. (2009) Enrichment of denitrifying anaerobic methane oxidizing microorganisms. *Environ Microbiol Rep* **1**: 377-384.
- Huber, H., Hohn, M.J., Stetter, K.O., and Rachel, R. (2003) The phylum Nanoarchaeota: present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Res Microbiol* **154**: 165-171.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., and Stetter, K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**: 63-67.
- Huber, T., Faulkner, G., and Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319.
- Hungate, R.E. (1966) *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press.
- Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol* **3**: 117-132.
- Huttunen, J.T., Alm, J., Liikanen, A., Juutinen, S., Larmola, T., Hammar, T., Silvola, J., and Martikainen, P.J. (2003) Fluxes of methane, carbon dioxide and nitrous oxide in boreal lakes and potential anthropogenic effects on the aquatic greenhouse gas emissions. *Chemosphere* **52**: 609-621.
- Im, J., Lee, S.W., Yoon, S., DiSpirito, A.A., and Semrau, J.D. (2011) Characterization of a novel facultative Methylocystis species capable of growth on methane, acetate and ethanol. *Environ Microbiol Rep* **3**: 174-181.
- Imachi, H., Sakai, S., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Kamagata, Y., Ohashi, A., and Harada, H. (2008) Methanolinea tarda gen. nov., sp nov., a methane-producing archaeon isolated from a methanogenic digester sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 294-301.

- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A., Suzuki, M., Takai, K., Delwiche, M. et al. (2006) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2815-2820
- Ingalls, A.E., Shah, S.R., Hansman, R.L., Aluwihare, L.I., Santos, G.M., Druffel, E.R.M., and Pearson, A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6442-6447.
- Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L.J., Larsen, O., and Birkeland, N.K. (2008) Methane oxidation at 55 degrees C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 300-304.
- Islas-Lima, S., Thalasso, F., and Gómez-Hernandez, J. (2004) Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Water Res* **38**: 13-16.
- Iversen, N., Oremland, R.S., and Klug, M.J. (1987) Big Soda Lake (Nevada). 3. Pelagic methanogenesis and anaerobic methane oxidation. *Limnol Oceanogr* **32**: 804-814.
- Jamet, D., Amblard, C., and Devaux, J. (1997) Seasonal changes in alkaline phosphatase activity of bacteria and microalgae in Lake Pavin (Massif Central, France). *Hydrobiologia* **347**: 185-195.
- Janssen, P.H. (2003) Selective enrichment and purification of cultures of *Methanosaeta* spp. *J Microbiol Methods* **52**: 239-244.
- Janssen, P.H. (2010) Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim Feed Sci Technol* **160**: 1-22.
- Jardillier, L., Bettarel, Y., Richardot, M., Bardot, C., Amblard, C., Sime-Ngando, T., and Debroas, D. (2005) Effects of viruses and predators on prokaryotic community composition. *Microb Ecol* **50**: 557-569.
- Jarrell, K.F., Walters, A.D., Bochiwal, C., Borgia, J.M., Dickinson, T., and Chong, J.P.J. (2011) Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiology* **157**: 919-936.
- Jeon, S., Bunge, J., Leslin, C., Stoeck, T., Hong, S., and Epstein, S. (2008) Environmental rRNA inventories miss over half of protistan diversity. *BMC Microbiol* **8**: doi:10.1186/1471-2180-1188-1222.
- Jetten, M.S.M., Stams, A.J.M., and Zehnder, A.J.B. (1992) Methanogenesis from Acetate - a Comparison of the Acetate Metabolism in *Methanotrix-Soehngenii* and *Methanosarcina* Spp. *FEMS Microbiol Rev* **88**: 181-197.
- Jézéquel, D., Michard, G., Viollier, E., Prévot, F., Groleau, A., Sarazin, G., and Lopes, F. (2010) Le cycle du carbone et les risques d'éruption gazeuse au Pavin. *Revue des Sciences Naturelles d'Auvergne* **74**: 67-86.
- Jézéquel, D., Sarazin, G., Prévot, F., Viollier, E., Groleau, A., Agrinier, P., Albéric, P., Binet, S., Bergonzini, L. et al. (in preps.) Bilan hydrique du lac Pavin. *Revue des Sciences Naturelles d'Auvergne*.
- Jiang, H., Dong, H., Yu, B., Liu, X., Li, Y., Ji, S., and Zhang, C.L. (2007) Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environ Microbiol* **9**: 2603-2621.
- Jiang, H.C., Dong, H.L., Yu, B.S., Ye, Q., Shen, J., Rowe, H., and Zhang, C.L. (2008) Dominance of putative marine benthic Archaea in Qinghai Lake, north-western China. *Environ Microbiol* **10**: 2355-2367.
- Jiang, S.C., and Paul, J.H. (1995) Viral contribution to dissolved DNA in the marine environment as determined by differential centrifugation and kingdom probing. *Appl Environ Microbiol* **61**: 317-325.
- Jones, S.E., and Lennon, J.T. (2009) Evidence for limited microbial transfer of methane in a

- planktonic food web. *Aquat Microb Ecol* **58**: 45-53.
- Joye, S.B., Connell, T.L., Miller, L.G., Oremland, R.S., and Jellison, R.S. (1999) Oxidation of ammonia and methane in an alkaline, saline lake. *Limnol Oceanogr* **44**: 178-188.
- Juottonen, H., Galand, P.E., Tuittila, E.S., Laine, J., Fritze, H., and Yrjala, K. (2005) Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environ Microbiol* **7**: 1547-1557.
- Jurgens, G., Glockner, F.O., Amann, R., Saano, A., Montonen, L., Likolammi, M., and Munster, U. (2000) Identification of novel Archaea in bacterioplankton of a boreal forest lake by phylogenetic analysis and fluorescent in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* **34**: 45-56.
- Kalyuzhnaya, M.G., Stolyar, S.M., Auman, A.J., Lara, J.C., Lidstrom, M.E., and Chistoserdova, L. (2005) *Methylosarcina lacus* sp. nov., a methanotroph from Lake Washington, Seattle, USA, and emended description of the genus *Methylosarcina*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2345-2350.
- Kankaala, P., Eller, G., and Jones, R.I. (2007a) Could bacterivorous zooplankton affect lake pelagic methanotrophic activity? *Fundam Appl Limnol* **169**: 203-209.
- Kankaala, P., Taipale, S., Nykanen, H., and Jones, R.I. (2007b) Oxidation, efflux, and isotopic fractionation of methane during autumnal turnover in a polyhumic, boreal lake. *J Geophys Res Biogeosci* **112**: doi:10.1029/2006JG000336
- Kankaala, P., Taipale, S., Grey, J., Sonninen, E., Arvola, L., and Jones, R.I. (2006) Experimental delta C-13 evidence for a contribution of methane to pelagic food webs in lakes. *Limnol Oceanogr* **51**: 2821-2827.
- Karadagli, F., and Rittmann, B.E. (2007) A mathematical model for the kinetics of *Methanobacterium bryantii* M.o.H. considering hydrogen thresholds. *Biodegradation* **18**: 453-464.
- Kaserer, H. (1905) Ueber die oxydation des wasserstoffes und des methane durch mikroorganismen (Sur l'oxydation de l'hydrogène et du méthane par les microorganismes). *Z landw Versuchsw in Osterreich* **8**: 789-792.
- Kemnitz, D., Kolb, S., and Conrad, R. (2005) Phenotypic characterization of Rice Cluster III archaea without prior isolation by applying quantitative polymerase chain reaction to an enrichment culture. *Environ Microbiol* **7**: 553-565.
- Kendall, M., and Boone, D. (2006) The Order Methanosarcinales. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Kendall, M., and Boone, D. (eds): Springer New York, pp. 244-256.
- Keppler, F., Hamilton, J.T.G., Braß, M., and Röckmann, T. (2006) Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* **439**: 187-191.
- Kerkhof, L., and Kemp, P. (1999) Small ribosomal RNA content in marine Proteobacteria during non steady state growth. *FEMS Microbiol Ecol* **30**: 253-260.
- King, G.M. (1991) Measurement of acetate concentrations in marine pore waters by using an enzymatic approach. *Appl Environ Microbiol* **57**: 3476-3481.
- Kitamura, K., Fujita, T., Akada, S., and Tonouchi, A. (2010) *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 1246-1252.
- Kiyashko, S.I., Imbs, A.B., Narita, T., Svetashev, V.I., and Wada, E. (2004) Fatty acid composition of aquatic insect larvae *Stictochironomus pictulus* (Diptera : Chironomidae): evidence of feeding upon methanotrophic bacteria. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* **139**: 705-711.
- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M., and Ingvorsen, K.

- (2007) Diversity of sulfate reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 287-298.
- Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M., and Schmidt, T.M. (2000) rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1328-1333.
- Knief, C., and Dunfield, P.F. (2005) Response and adaptation of different methanotrophic bacteria to low methane mixing ratios. *Environ Microbiol* **7**: 1307-1317.
- Knittel, K., and Boetius, A. (2009) Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* **63**: 311-334.
- Knittel, K., Losekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467-479.
- Knox, M., and Harris, J. (1986) Isolation and characterization of a bacteriophage of *Methanobrevibacter smithii*. In *XIV International Congress on Microbiology*. Manchester, England.
- Koizumi, Y., Kojima, H., and Fukui, M. (2003a) Characterization of depth-related microbial community structure in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rDNA and reversely transcribed 16S rRNA fragments. *FEMS Microbiol Ecol* **46**: 147-157.
- Koizumi, Y., Takii, S., and Fukui, M. (2004) Depth-related change in archaeal community structure in a freshwater lake sediment as determined with denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA genes and reversely transcribed rRNA fragments. *FEMS Microbiol Ecol* **48**: 285-292.
- Koizumi, Y., Takii, S., Nishino, M., and Nakajima, T. (2003b) Vertical distributions of sulfate-reducing bacteria and methane-producing archaea quantified by oligonucleotide probe hybridization in the profundal sediment of a mesotrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 101-108.
- Kojima, H., Fukuhara, H., and Fukui, M. (2009a) Community structure of microorganisms associated with reddish-brown iron-rich snow. *Syst Appl Microbiol* **32**: 429-437.
- Kojima, H., Iwata, T., and Fukui, M. (2009b) DNA-based analysis of planktonic methanotrophs in a stratified lake. *Freshw Biol* **54**: 1501-1509.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Koonin, E.V., and Martin, W. (2005) On the origin of genomes and cells within inorganic compartments. *Trends Genet* **21**: 647-654.
- Kramer, J.G., and Singleton, F.L. (1992) Variations in rRNA content of marine *Vibrio* spp. during starvation-survival and recovery. *Appl Environ Microbiol* **58**: 201-207.
- Krivushin, K.V., Shcherbakova, V.A., Petrovskaya, L.E., and Rivkina, E.M. (2010) *Methanobacterium veterum* sp. nov., from ancient Siberian permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 455-459.
- Kruger, M., Meyerdierks, A., Glockner, F.O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, R., Bocher, R. et al. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically. *Nature* **426**: 878-881.
- Krupovic, M., Forterre, P., and Bamford, D.H. (2010) Comparative analysis of the mosaic genomes of tailed archaeal viruses and proviruses suggests common themes for virion architecture and assembly with tailed viruses of bacteria. *J Mol Biol* **397**: 144-160.
- Krupovic, M., Spang, A., Gribaldo, S., Forterre, P., and Schleper, C. (2011) A thaumarchaeal provirus testifies for an ancient association of tailed viruses with archaea. *Biochem Soc Trans* **39**: 82-88.

- Kuivila, K., Murray, J., Devol, A., Lidstrom, M., and Reimers, C.E. (1988) Methane cycling in the sediments of Lake Washington. *Limnol Oceanogr* **33**: 571-581.
- Kuivila, K.M., Murray, J.W., Devol, A.H., and Novelli, P.C. (1989) Methane production, sulfate reduction and competition for substrates in the sediments of Lake Washington. *Geochim Cosmochim Acta* **53**: 409-416.
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P. et al. (2008) The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**: 100-104.
- Lai, M.C., and Chen, S.C. (2001) Methanofollis aquaemaris sp. nov., a methanogen isolated from an aquaculture fish pond. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1873-1880.
- Lake, J.A., Servin, J.A., Herbold, C.W., and Skophammer, R.G. (2008) Evidence for a new root of the tree of life. *Syst Biol* **57**: 835-843.
- Lecompte, O., Ripp, R., Thierry, J.C., Moras, D., and Poch, O. (2002) Comparative analysis of ribosomal proteins in complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res* **30**: 5382-5390.
- Lefevre, E., Bardot, C., Noel, C., Carrias, J.-F., Viscogliosi, E., Amblard, C., and Sime-Ngando, T. (2007) Unveiling fungal zooflagellates as members of freshwater picoeukaryotes: evidence from a molecular diversity study in a deep meromictic lake. *Environ Microbiol* **9**: 61-71.
- Lehours, A.-C., Batisson, I., Guedon, A., Mailhot, G., and Fonty, G. (2009) Diversity of culturable bacteria, from the anaerobic zone of the meromictic Lake Pavin, able to perform dissimilatory-iron reduction in different in vitro conditions. *Geomicrobiol J* **26**: 212-223.
- Lehours, A.C. (2006) La communauté procaryotique dans les zone anoxiques de deux écosystèmes lacustres : structure et diversité. Etude plus particulière de son rôle fonctionnel dans le monimolimnion d'un lac méromictique (Lac Pavin). In. Aubière: Université Blaise Pascal, p. 391.
- Lehours, A.C., Bardot, C., Thenot, A., Debroas, D., and Fonty, G. (2005) Anaerobic microbial communities in Lake Pavin, a unique meromictic lake in France. *Appl Environ Microbiol* **71**: 7389-7400.
- Lehours, A.C., Evans, P., Bardot, C., Joblin, K., and Gerard, F. (2007) Phylogenetic diversity of archaea and bacteria in the anoxic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, France). *Appl Environ Microbiol* **73**: 2016-2019.
- Lehours, A.C., Rabiet, M., Morel-Desrosiers, N., Morel, J.P., Jouve, L., Arbeille, B., Mailhot, G., and Fonty, G. (2010) Ferric iron reduction by fermentative strain BS2 isolated from an iron-rich anoxic environment (Lake Pavin, France). *Geomicrobiol J* **27**: 714-722.
- Leigh, J. (2005) Genomics of diazotrophic archaea. In *Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms*. Palacios, R., and Newton, W. (eds). New York: Springer, pp. 7-12.
- Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G., Prosser, J., Schuster, S., and Schleper, C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* **442**: 806-809.
- Leipe, D.D., Aravind, L., and Koonin, E.V. (1999) Did DNA replication evolve twice independently? *Nucleic Acids Res* **27**: 3389-3401.
- Lelieveld, J., Crutzen, P.J., and Dentener, F.J. (1998) Changing concentration, lifetime and climate forcing of atmospheric methane. *Tellus B* **50**: 128-150.
- Lemarchand, C., Jardillier, L., Carrias, J.-F., Richardot, M., Debroas, D., Sime-Ngando, T., and Amblard, C. (2006) Community composition and activity of prokaryotes associated to detrital particles in two contrasting lake ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* **57**: 442-451.

- Lepere, C., Boucher, D., Jardillier, L., Domaizon, I., and Debroas, D. (2006) Succession and regulation factors of small eukaryote community composition in a lacustrine ecosystem (Lake pavin). *Appl Environ Microbiol* **72**: 2971-2981.
- Leroy, M., Prigent, M., Dutertre, M., Confalonieri, F., and Dubow, M. (2008) Bacteriophage morphotype and genome diversity in Seine River sediment. *Freshw Biol* **53**: 1176-1185.
- Liebner, S., Rublack, K., Stuehrmann, T., and Wagner, D. (2009) Diversity of aerobic methanotrophic bacteria in a permafrost active layer soil of the Lena Delta, Siberia. *Microb Ecol* **57**: 25-35.
- Liikanen, A., and Martikainen, P.J. (2003) Effect of ammonium and oxygen on methane and nitrous oxide fluxes across sediment-water interface in a eutrophic lake. *Chemosphere* **52**: 1287-1293.
- Liikanen, A., Huttunen, J.T., Valli, K., and Martikainen, P.J. (2002) Methane cycling in the sediment and water column of mid-boreal hyper-eutrophic Lake Kevätön, Finland. *Arch Hydrobiol* **154**: 585-603.
- Lin, L., Bitner, R., and Edlin, G. (1977) Increased reproductive fitness of *Escherichia coli* lambda lysogens. *J Virol* **21**: 554-559.
- Lipp, J.S., Morono, Y., Inagaki, F., and Hinrichs, K.U. (2008) Significant contribution of Archaea to extant biomass in marine subsurface sediments. *Nature* **454**: 991-994.
- Lipscomb, J.D. (1994) Biochemistry of the soluble methane monooxygenase. *Annu Rev Microbiol* **48**: 371-399.
- Liu, Y. (2010) Methanopyrales. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 605-607.
- Liu, Y., and Whitman, W.B. (2008) Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 171-189.
- Lliros, M., Gich, F., Plasencia, A., Auguet, J.C., Darchambeau, F., Casamayor, E.O., Descy, J.P., and Borrego, C. (2010) Vertical distribution of ammonia-oxidizing Crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of Lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo). *Appl Environ Microbiol* **76**: 6853-6863.
- Lloyd, K.G., Alperin, M.J., and Teske, A. (2011) Environmental evidence for net methane production and oxidation in putative ANaerobic MEthanotrophic (ANME) archaea. *Environ Microbiol* **13**: 2548-2564.
- Lomans, B.P., Smolders, A.J.P., Intven, L.M., Pol, A., denCamp, H., and vanderDrift, C. (1997) Formation of dimethyl sulfide and methanethiol in anoxic freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4741-4747.
- Lomans, B.P., Maas, R., Luderer, R., Op den Camp, H.J.M., Pol, A., van der Drift, C., and Vogels, G.D. (1999) Isolation and characterization of Methanomethylovorans hollandica gen. nov., sp. nov., isolated from freshwater sediment, a methylotrophic methanogen able to grow on dimethyl sulfide and methanethiol. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3641-3650.
- Lomans, B.P., Luderer, R., Steenbakkens, P., Pol, A., van der Drift, C., Vogels, G.D., and Op den Camp, H.J.M. (2001) Microbial Populations Involved in Cycling of Dimethyl Sulfide and Methanethiol in Freshwater Sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1044-1051.
- Lopes, F., Viollier, E., Thiam, A., Michard, G., Abril, G., Groleau, A., Prévot, F., Carrias, J.F., Albéric, P. et al. (2011) Biogeochemical modelling of anaerobic vs. aerobic methane oxidation in a meromictic crater lake (Lake Pavin, France). *Appl Geochem* **26**: 1919-1932.
- López-Bueno, A., Tamames, J., Velázquez, D., Moya, A., Quesada, A., and Alcamí, A. (2009) High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science* **326**: 858-861
- Lovley, D.R., and Klug, M.J. (1983a) Methanogenesis from methanol and methylamines and acetogenesis from hydrogen

- and carbon-dioxide in the sediments of a eutrophic lake. *Appl Environ Microbiol* **45**: 1310-1315.
- Lovley, D.R., and Klug, M.J. (1983b) Sulfate reducers can outcompete methanogens at freshwater sulfate concentrations. *Appl Environ Microbiol* **45**: 187-192.
- Lovley, D.R., and Klug, M.J. (1986) Model for the distribution of sulfate reduction and methanogenesis in freshwater sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **50**: 11-18.
- Lovley, D.R., and Phillips, E.J.P. (1987) Competitive mechanisms for inhibition of sulfate reduction and methane production in the zone of ferric iron reduction in sediments. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2636-2641.
- Lovley, D.R., and Goodwin, S. (1988) Hydrogen concentrations as an indicator of the predominant terminal electron-accepting reactions in aquatic sediments. *Geochim Cosmochim Acta* **52**: 2993-3003.
- Loy, A., Arnold, R., Tischler, P., Rattei, T., Wagner, M., and Horn, M. (2008) probeCheck—a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol* **10**: 2894-2898.
- Lu, Y.H., Lueders, T., Friedrich, M.W., and Conrad, R. (2005) Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environ Microbiol* **7**: 326-336.
- Luesken, F.A., Zhu, B., van Alen, T.A., Butler, M.K., Rodriguez Diaz, M., Song, B., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Ettwig, K.F. (in press) pmoA primers for detection of anaerobic methanotrophs. *Appl Environ Microbiol*: doi: 10.1128/AEM.02960-02910.
- Luna, G.M., Manini, E., and Danovaro, R. (2002) Large fraction of dead and inactive bacteria in coastal marine sediments: comparison of protocols for determination and ecological significance. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3509-3513.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W. (2002) The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.
- Ma, K., Liu, X.L., and Dong, X.Z. (2005) Methanobacterium beijingense sp nov., a novel methanogen isolated from anaerobic digesters. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 325-329.
- Ma, K., Liu, X., and Dong, X. (2006) Methanosaeta harundinacea sp. nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 127-131.
- Magurran, A.E. (1988) *Ecological diversity and its measurement*. Princeton: Taylor & Francis.
- Marie, D., Brussaard, C.P.D., Thyraug, R., Bratbak, G., and Vaulot, D. (1999) Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **65**: 45-52.
- Martens-Habbena, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de La Torre, J.R., and Stahl, D.A. (2009) Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying Archaea and Bacteria. *Nature* **461**: 976-979.
- Martens, C.S., and Berner, R.A. (1974) Methane production in interstitial waters of sulfate-depleted marine sediments. *Science* **185**: 1167-1169.
- Matsumi, R., Atomi, H., Driessen, A.J.M., and van der Oost, J. (2010) Isoprenoid biosynthesis in Archaea-Biochemical and evolutionary implications. *Res Microbiol* **162**: 39-52.
- Mattson, M.D., and Likens, G.E. (1992) Redox reactions of organic matter decomposition in a soft water lake. *Biogeochemistry* **19**: 149-172.
- Maurice, C., Bouvier, T., Comte, J., Guillemette, F., and Del Giorgio, P. (2010) Seasonal variations of phage life strategies and bacterial physiological states in three northern temperate lakes. *Environ Microbiol* **12**: 628-641.

- Maurin, N., Amblard, C., and Bourdier, G. (1997) Phytoplanktonic excretion and bacterial reassimilation in an oligomesotrophic lake: molecular weight fractionation. *J Plankton Res* **19**: 1045-1068.
- Mayr, S., Latkoczy, C., Kruger, M., Gunther, D., Shima, S., Thauer, R.K., Widdel, F., and Jaun, B. (2008) Structure of an F430 variant from archaea associated with anaerobic oxidation of methane. *J Am Chem Soc* **130**: 10758-10767.
- Mei, M.L., and Danovaro, R. (2004) Virus production and life strategies in aquatic sediments. *Limnol Oceanogr* **49**: 459-470.
- Meile, L., Jenal, U., Studer, D., Jordan, M., and Leisinger, T. (1989) Characterization of M1, a virulent phage of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *Arch Microbiol* **152**: 105-110.
- Mesbah, M., Premachandran, U., and Whitman, W. (1989) Precise measurement of the G+ C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 159-167.
- Metje, M., and Frenzel, P. (2007) Methanogenesis and methanogenic pathways in a peat from subarctic permafrost. *Environ Microbiol* **9**: 954-964.
- Meybeck, M. (in preps.) Le Pavin et ses voisins, histoire d'un patrimoine européen unique. *Revue des Sciences Naturelles d'Auvergne*.
- Michard, G. (2010) Le monstre du lac Nyos se cache-t-il au fond du Pavin? *Eruption* **23**: 40.
- Michard, G., Jézéquel, D., and Viollier, E. (2003) Vitesses des réactions de dissolution et précipitation au voisinage de l'interface oxydo-réducteur dans un lac méromictique: le lac Pavin (Puy de Dôme, France). *Rev Sci Eau* **12**: 199-218.
- Michard, G., Viollier, E., Jezequel, D., and Sarazin, G. (1994) Geochemical study of a crater lake: Pavin Lake, France--Identification, location and quantification of the chemical reactions in the lake. *Chem Geol* **115**: 103-115.
- Middelboe, M., and Glud, R.N. (2006) Viral activity along a trophic gradient in continental margin sediments off central Chile. *Mar Biol Res* **2**: 41-51.
- Middelboe, M., Glud, R.N., and Finster, K. (2003) Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnol Oceanogr* **48**: 1447-1456.
- Middelboe, M., Glud, R.N., Wenzhöfer, F., Oguri, K., and Kitazato, H. (2006) Spatial distribution and activity of viruses in the deep-sea sediments of Sagami Bay, Japan. *Deep Sea Res Part I* **53**: 1-13.
- Middelburg, J.J., Vlug, T., and Vandernat, F. (1993) Organic matter mineralization in marine systems. *Global Planet Change* **8**: 47-58.
- Mihajlovski, A., Alric, M., and Brugere, J.F. (2008) A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the mcrA gene. *Res Microbiol* **159**: 516-521.
- Mihajlovski, A., Dore, J., Levenez, F., Alric, M., and Brugere, J.F. (2010) Molecular evaluation of the human gut methanogenic archaeal microbiota reveals an age-associated increase of the diversity. *Environ Microbiol Rep* **2**: 272-280.
- Milferstedt, K., Youngblut, N.D., and Whitaker, R.J. (2010) Spatial structure and persistence of methanogen populations in humic bog lakes. *ISME J* **4**: 764-776.
- Mink, R.W., and Dugan, P.R. (1977) Tentative Identification of Methanogenic Bacteria by Fluorescence Microscopy. *Appl Environ Microbiol* **33**: 713-717.
- Mohanty, S.R., Bodelier, P.L.E., Floris, V., and Conrad, R. (2006) Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1346-1354.
- Mori, K., and Harayama, S. (2011) *Methanobacterium petrolearium* sp. nov. and *Methanobacterium ferruginis* sp. nov., mesophilic methanogens isolated from salty

- environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 138-143.
- Muller, F., Brissac, T., Le Bris, N., Felbeck, H., and Gros, O. (2010) First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environ Microbiol* **12**: 2371-2383.
- Munson, M.A., Nedwell, D.B., and Embley, T.M. (1997) Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4729-4733.
- Murase, J., and Sugimoto, A. (2005) Inhibitory effect of light on methane oxidation in the pelagic water column of a mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Limnol Oceanogr* **50**: 1339-1343.
- Murase, J., and Frenzel, P. (2007) A methane-driven microbial food web in a wetland rice soil. *Environ Microbiol* **9**: 3025-3034.
- Murrell, J.C., Gilbert, B., and McDonald, I.R. (2000) Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Arch Microbiol* **173**: 325-332.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.
- Nam, Y.D., Sung, Y., Chang, H.W., Roh, S.W., Kim, K.H., Rhee, S.K., Kim, J.C., Kim, J.Y., Yoon, J.H. et al. (2008) Characterization of the depth-related changes in the microbial communities in Lake Hovsgol sediment by 16S rRNA gene-based approaches. *J Microbiol* **46**: 125-136.
- Nauhaus, K., Boetius, A., Kruger, M., and Widdel, F. (2002) In vitro demonstration of anaerobic oxidation of methane coupled to sulphate reduction in sediment from a marine gas hydrate area. *Environ Microbiol* **4**: 296-305.
- Nauhaus, K., Treude, T., Boetius, A., and Kruger, M. (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environ Microbiol* **7**: 98-106.
- Nealson, K.H., and Popa, R. (2005) Introduction and overview: What do we know for sure? *Am J Sci* **305**: 449-466.
- Nercessian, O., Noyes, E., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., and Chistoserdova, L. (2005) Bacterial populations active in metabolism of C-1 compounds in the sediment of Lake Washington, a freshwater lake. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6885-6899.
- Nettmann, E., Bergmann, I., Mundt, K., Linke, B., and Klocke, M. (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and mcrA analysis. *J Appl Microbiol* **105**: 1835-1850.
- Noble, R.T., and Fuhrman, J.A. (1997) Virus decay and its causes in coastal waters. *Appl Environ Microbiol* **63**: 77-83.
- Noble, R.T., and Fuhrman, J.A. (1999) Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products. *Aquat Microb Ecol* **20**: 1-11.
- Nold, S.C., Boschker, H.T.S., Pel, R., and Laanbroek, H.J. (1999) Ammonium addition inhibits C-13-methane incorporation into methanotroph membrane lipids in a freshwater sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **29**: 81-89.
- Nölling, J., Groffen, A., and de Vos, W.M. (1993) ϕ F1 and ϕ F3, two novel virulent, archaeal phages infecting different thermophilic strains of the genus *Methanobacterium*. *J Gen Microbiol* **139**: 2511-2516.
- Nomura, M., Gourse, R., and Baughman, G. (1984) Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. *Annu Rev Biochem* **53**: 75-117.
- Nozhevnikova, A.N., Nekrasova, V., Ammann, A., Zehnder, A.J.B., Wehrli, B., and Holliger, C. (2007) Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in

- lake sediment slurries. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 336-344.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.J., Hattori, M., Kanai, A. et al. (2011) Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res* **39**: 3204-3223.
- Nüsslein, B., Eckert, W., and Conrad, R. (2003) Stable isotope biogeochemistry of methane formation in profundal sediments of Lake Kinneret (Israel). *Limnol Oceanogr* **48**: 1439-1446.
- Nüsslein, B., Chin, K.-J., Eckert, W., and Conrad, R. (2001) Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel). *Environ Microbiol* **3**: 460-470.
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., and Schleper, C. (2003) Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environ Microbiol* **5**: 787-797.
- Omelchenko, M.V., Vasileva, L.V., Zavarzin, G.A., Saveleva, N.D., Lysenko, A.M., Mityushina, L.L., Kamelenina, V.N., and Trotsenko, Y.A. (1996) A novel psychrophilic methanotroph of the genus *Methylobacter*. *Microbiology* **65**: 339-343.
- Op den Camp, H.J.M., Islam, T., Stott, M.B., Harhangi, H.R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M.S.M., Birkeland, N.-K., Pol, A. et al. (2009) Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environ Microbiol Rep* **1**: 293-306.
- Oppenheimer, C.H. (1960) Bacterial activity in sediments of shallow marine bays. *Geochim Cosmochim Acta* **19**: 244-246.
- Oremland, R.S., and Polcin, S. (1982) Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and noncompetitive substrates in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* **44**: 1270-1276.
- Oren, A. (2011) Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* **13**: 1908-1923.
- Oren, A., Bratbak, G., and Haldal, M. (1997) Occurrence of virus-like particles in the Dead Sea. *Extremophiles* **1**: 143-149.
- Orphan, V.J., House, C.H., Hinrichs, K.U., McKeegan, K.D., and DeLong, E.F. (2001) Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. *Science* **293**: 484-487.
- Ortmann, A.C., and Suttle, C.A. (2005) High abundances of viruses in a deep-sea hydrothermal vent system indicates viral mediated microbial mortality. *Deep Sea Res Part I* **52**: 1515-1527.
- Palm, P., Schleper, C., Grampp, B., Yeats, S., McWilliam, P., Reiter, W.D., and Zillig, W. (1991) Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the archaeobacterium *Sulfolobus shibatae*. *Virology* **185**: 242-250.
- Pancost, R.D., Damste, J.S.S., de Lint, S., van der Maarel, M., and Gottschal, J.C. (2000) Biomarker evidence for widespread anaerobic methane oxidation in Mediterranean sediments by a consortium of methanogenic archaea and bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1126-1132.
- Panganiban, A.T., Patt, T.E., Hart, W., and Hanson, R.S. (1979) Oxidation of methane in the absence of oxygen in lake water samples. *Appl Environ Microbiol* **37**: 303-309.
- Park, B.J., Park, S.J., Yoon, D.N., Schouten, S., Sinninghe Damste, J.S., and Rhee, S.K. (2010) Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in coculture with sulfur-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7575-7587.
- Park, M.O., Ikenaga, H., and Watanabe, K. (2007) Phage diversity in a methanogenic digester. *Microb Ecol* **53**: 98-103.

- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Fry, J.C., Herbert, R.A., Wimpenny, J.W.T., Allen, J.A., and Whitfield, M. (1990) Bacterial biomass and activity in deep sediment layers from the Peru Margin. *Philos Trans R Soc London, Ser A* **331**: 139-153.
- Parkes, R.J., Cragg, B.A., Getliff, J.M., Harvey, S.M., Fry, J.C., Lewis, C.A., and Rowland, S.J. (1993) A Quantitative Study of Microbial Decomposition of Biopolymers in Recent Sediments from the Peru Margin. *Mar Geol* **113**: 55-66.
- Patel, G.B., and Sprott, G.D. (1990) *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **40**: 79-82.
- Patt, T.E., Cole, G.C., Bland, J., and Hanson, R.S. (1974) Isolation and characterization of bacteria that grow on methane and organic compounds as sole sources of carbon and energy. *J Bacteriol* **120**: 955-964.
- Paul, J.H., Sullivan, M.B., Segall, A.M., and Rohwer, F. (2002) Marine phage genomics. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* **133**: 463-476.
- Pedersen, A.-G.U., Thomsen, T.R., Lomstein, B.A., and Jørgensen, N.O. (2001) Bacterial influence on amino acid enantiomerization in a coastal marine sediment. *Limnol Oceanogr* **46**: 1358-1369.
- Pester, M., Schleper, C., and Wagner, M. (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* **14**: 300-306.
- Pester, M., Friedrich, M.W., Schink, B., and Brune, A. (2004) pmoA-Based analysis of methanotrophs in a littoral lake sediment reveals a diverse and stable community in a dynamic environment. *Appl Environ Microbiol* **70**: 3138-3142.
- Pfister, P., Wasserfallen, A., Stettler, R., and Leisinger, T. (1998) Molecular analysis of *Methanobacterium* phage M2. *Mol Microbiol* **30**: 233-244.
- Pfluger, A.R., Wu, W.M., Pieja, A.J., Wan, J., Rostkowski, K.H., and Criddle, C.S. (2011) Selection of type I and type II methanotrophic proteobacteria in a fluidized bed reactor under non-sterile conditions. *Bioresour Technol* **102**: 9919-9926.
- Phelps, T.J., and Zeikus, J.G. (1985) Effect of fall turnover on terminal carbon metabolism in lake mendota sediments. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1285-1291.
- Pietila, M.K., Laurinavicius, S., Sund, J., Roine, E., and Bamford, D.H. (2010) The single-stranded DNA genome of novel archaeal virus Halorubrum pleomorphic virus 1 is enclosed in the envelope decorated with glycoprotein spikes. *J Virol* **84**: 788-798.
- Pietilä, M.K., Roine, E., Paulin, L., Kalkkinen, N., and Bamford, D.H. (2009) An ssDNA virus infecting archaea: a new lineage of viruses with a membrane envelope. *Mol Microbiol* **72**: 307-319.
- Pina, M., Bize, A., Forterre, P., and Prangishvili, D. (2011) The archeoviruses. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 1035-1054.
- Plasencia, A., Bañeras, L., Llíros, M., Casamayor, E.O., and Borrego, C. (2011) Maintenance of previously uncultured freshwater archaea from anoxic waters under laboratory conditions *Antonie Leeuwenhoek* **99**: 403-408.
- Pol, A., Heijmans, K., Harhangi, H.R., Tedesco, D., Jetten, M.S.M., and den Camp, H. (2007) Methanotrophy below pH1 by a new Verrucomicrobia species. *Nature* **450**: 874-U817.
- Porter, K., Russ, B.E., and Dyll-Smith, M.L. (2007) Virus-host interactions in salt lakes. *Curr Opin Microbiol* **10**: 418-424.
- Prangishvili, D. (2003) Evolutionary insights from studies on viruses of hyperthermophilic archaea. *Res Microbiol* **154**: 289-294.
- Prangishvili, D., and Garrett, R.A. (2005) Viruses of hyperthermophilic Crenarchaea. *Trends Microbiol* **13**: 535-542.

- Prangishvili, D., Garrett, R.A., and Koonin, E.V. (2006a) Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Res* **117**: 52-67.
- Prangishvili, D., Forterre, P., and Garrett, R.A. (2006b) Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Microbiol* **4**: 837-848.
- Prangishvili, D., Arnold, H.P., Götz, D., Ziese, U., Holz, I., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (1999) A novel virus family, the Rudiviridae: structure, virus-host interactions and genome variability of the *Sulfolobus* viruses SIRV1 and SIRV2. *Genetics* **152**: 1387-1396
- Price, P.B., and Sowers, T. (2004) Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance, and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4631-4636
- Purdy, K.J., Nedwell, D.B., and Embley, T.M. (2003) Analysis of the sulfate-reducing bacterial and methanogenic archaeal populations in contrasting Antarctic sediments. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3181-3191.
- Purdy, K.J., Embley, T.M., Takii, S., and Nedwell, D.B. (1996) Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a novel hydroxyapatite spin-column method. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3905-3907.
- Quax, T.E.F., Lucas, S., Reimann, J., Pehau-Arnaudet, G., Prevost, M.C., Forterre, P., Albers, S.V., and Prangishvili, D. (2011) Simple and elegant design of a virion egress structure in Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 3354-3359
- Rachel, R., Bettstetter, M., Hedlund, B., Häring, M., Kessler, A., Stetter, K.O., and Prangishvili, D. (2002) Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. *Arch Virol* **147**: 2419-2429.
- Raghoebarsing, A.A., Pol, A., van de Pas-Schoonen, K.T., Smolders, A.J.P., Ettwig, K.F., Rijpstra, W.I.C., Schouten, S., Damste, J.S.S., Op den Camp, H.J.M. et al. (2006) A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* **440**: 918-921.
- Ragsdale, S.W., and Kumar, M. (1996) Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Chem Rev* **96**: 2515-2539.
- Rahalkar, M., and Schink, B. (2007) Comparison of aerobic methanotrophic communities in littoral and profundal sediments of Lake Constance by a molecular approach. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4389-4394.
- Rahalkar, M., Bussmann, I., and Schink, B. (2007) *Methylosoma difficile* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1073-1080.
- Rahalkar, M., Deutzmann, J., Schink, B., and Bussmann, I. (2009) Abundance and activity of methanotrophic bacteria in littoral and profundal sediments of Lake Constance (Germany). *Appl Environ Microbiol* **75**: 119-126.
- Ramirez, E., and Villaverde, A. (1997) Viral spread within ageing bacterial populations. *Gene* **202**: 147-149.
- Rasconi, S., Jobard, M., Jouve, L., and Sime-Ngando, T. (2009) Use of calcofluor white for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2545-2553.
- Redder, P., Peng, X., Brügger, K., Shah, S.A., Roesch, F., Greve, B., She, Q., Schleper, C., Forterre, P. et al. (2009) Four newly isolated fuselloviruses from extreme geothermal environments reveal unusual morphologies and a possible intervalviral recombination mechanism. *Environ Microbiol* **11**: 2849-2862.
- Reeburgh, W.S. (1976) Methane consumption in Cariaco trench waters and sediments. *Earth Planet Sci Lett* **28**: 337-344.
- Reeburgh, W.S. (2007) Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* **107**: 486-513.

- Rhee, T.S., Kettle, A.J., and Andreae, M.O. (2009) Methane and nitrous oxide emissions from the ocean: A reassessment using basin-wide observations in the Atlantic. *J Geophys Res D: Atmos* **114**: doi:10.1029/2008JD011662
- Ripp, S., and Miller, R.V. (1997) The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* **143**: 2065-2070.
- Rohwer, F., and Edwards, R. (2002) The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol* **184**: 4529-4535.
- Rohwer, F., and Thurber, R.V. (2009) Viruses manipulate the marine environment. *Nature* **459**: 207-212.
- Rohwer, F., Prangishvili, D., and Lindell, D. (2009) Roles of viruses in the environment. *Environ Microbiol* **11**: 2771-2774.
- Roslev, P., Iversen, N., and Henriksen, K. (1997) Oxidation and assimilation of atmospheric methane by soil methane oxidizers. *Appl Environ Microbiol* **63**: 874-880.
- Rosset, R., Julien, J., and Monier, R. (1966) Ribonucleic acid composition of bacteria as a function of growth rate. *J Mol Biol* **18**: 308-320.
- Roussel, E.G., Sauvadet, A.L., Chaduteau, C., Fouquet, Y., Charlou, J.L., Prieur, D., and Bonavita, M.A.C. (2009) Archaeal communities associated with shallow to deep seafloor sediments of the New Caledonia Basin. *Environ Microbiol* **11**: 2446-2462.
- Rudd, J.W.M., and Hamilton, R. (1978) Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. *Limnol Oceanogr* **23**: 337-348.
- Rudd, J.W.M., Furutani, A., Flett, R.J., and Hamilton, R.D. (1976) Factors controlling methane oxidation in shield lakes - Role of nitrogen fixation and oxygen concentration. *Limnol Oceanogr* **21**: 357-364.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Sakai, S., Ehara, M., and Tseng, I. (in press) Methanolinea mesophila, sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen isolated from a rice field in Taiwan, and proposal of the new archaeal family Methanoregulaceae fam. nov. within the order Methanomicrobiales. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Sakai, S., Imachi, H., Sekiguchi, Y., and Tseng, I. (2009) Cultivation of methanogens under low-hydrogen conditions by using the coculture method. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4892-4896
- Sakai, S., Conrad, R., Liesack, W., and Imachi, H. (2010) Methanocella arvoryzae sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from Italian rice field soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 2918-2923.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- S  wstr  m, C., Ask, J., and Karlsson, J. (2009) Viruses in subarctic lakes and their impact on benthic and pelagic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 471-482.
- Scheller, S., Goenrich, M., Boecher, R., Thauer, R.K., and Jaun, B. (2010) The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane. *Nature* **465**: 606-608.
- Schettler, G., Schwab, M.J., and Stebich, M. (2007) A 700-year record of climate change based on geochemical and palynological data from varved sediments (Lac Pavin, France). *Chem Geol* **240**: 11-35.
- Schink, B. (1988) Principles and limits of anaerobic degradation: environmental and technological aspects. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder, A.J.B. (ed). New York: John Wiley & Sons, pp. 771-846.
- Schleper, C., and Nicol, G.W. (2010) Ammonia-oxidising archaea—physiology, ecology and evolution. *Adv Microb Physiol* **57**: 1–41.

- Schleper, C., Jurgens, G., and Jonscheit, M. (2005) Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Microbiol* **3**: 479-488.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1501-1506.
- Schonheit, P., Keweloh, H., and Thauer, R.K. (1981) Factor F420 degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol Lett* **12**: 347-349.
- Schubert, C.J., Vazquez, F., Lösekann-Behrens, T., Knittel, K., Tonolla, M., and Boetius, A. (2011) Evidence for anaerobic oxidation of methane in sediments of a freshwater system (Lago di Cadagno). *FEMS Microbiol Ecol* **76**: 26-38.
- Schubert, C.J., Lucas, F.S., Durisch-Kaiser, E., Stierli, R., Diem, T., Scheidegger, O., Vazquez, F., and Muller, B. (2010) Oxidation and emission of methane in a monomictic lake (Rotsee, Switzerland). *Aquat Sci* **72**: 455-466.
- Schulz, M., Faber, E., Hollerbach, A., Schröder, H., and Güde, H. (2001) The methane cycle in the epilimnion of Lake Constance. *Arch Hydrobiol* **151**: 157-176.
- Schulz, S., and Conrad, R. (1995) Effect of algal deposition on acetate and methane concentrations in the profundal sediment of a deep lake (Lake Constance). *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 251-259.
- Schulz, S., and Conrad, R. (1996) Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiol Ecol* **20**: 1-14.
- Schwarz, J.I.K., Eckert, W., and Conrad, R. (2007) Community structure of Archaea and Bacteria in a profundal lake sediment Lake Kinneret (Israel). *Syst Appl Microbiol* **30**: 239-254.
- Schwarz, J.I.K., Eckert, W., and Conrad, R. (2008) Response of the methanogenic microbial community of a profundal lake sediment (Lake Kinneret, Israel) to algal deposition. *Limnol Oceanogr* **53**: 113-121.
- Seeger, A., Langworthy, T., and Stetter, K. (1988) *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *Syst Appl Microbiol* **10**: 161-171.
- Segers, R. (1998) Methane production and methane consumption: a review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* **41**: 23-51.
- Semrau, J.D., DiSpirito, A.A., and Yoon, S. (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 496-531.
- Shcherbakova, V., Rivkina, E., Pecheritsyna, S., Laurinavichius, K., Suzina, N., and Gilichinsky, D. (2011) *Methanobacterium arcticum* sp. nov., a methanogenic archaeon from Holocene Arctic permafrost. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 144-147.
- Shima, S., and Thauer, R.K. (2005) Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**: 643-648.
- Shlimon, A.G., Friedrich, M.W., Niemann, H., Ramsing, N.B., and Finster, K. (2004) *Methanobacterium aarhusense* sp nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 759-763.
- Simankova, M.V., Parshina, S.N., Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Zehnder, A.J.B., and Nozhevnikova, A.N. (2001) *Methanosarcina lacustris* sp. nov., a new psychrotolerant methanogenic archaeon from anoxic lake sediments. *Syst Appl Microbiol* **24**: 362-367.
- Sime-Ngando, T., and Colombet, J. (2009) Virus et prophages dans les écosystèmes aquatiques. *Can J Microbiol* **55**: 95-109.
- Sime-Ngando, T., Lucas, S., Robin, A., Tucker, K.P., Colombet, J., Bettarel, Y., Desmond, E.,

- Gribaldo, S., Forterre, P. et al. (2011) Diversity of virus–host systems in hypersaline Lake Retba, Senegal. *Environ Microbiol* **13**: 1956–1972.
- Sinke, A.J.C., Cornelese, A.A., Cappenberg, T.E., and Zehnder, A.J.B. (1992) Seasonal variation in sulfate reduction and methanogenesis in peaty sediments of eutrophic lake Loosdrecht, the Netherlands. *Biogeochemistry* **16**: 43–61.
- Skillman, L.C., Evans, P.N., Naylor, G.E., Morvan, B., Jarvis, G.N., and Joblin, K.N. (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277–285.
- Smith, K.S., and Ingram-Smith, C. (2007) Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends Microbiol* **15**: 150–155.
- Smith, L.K., and Lewis, W. (1992) Seasonality of methane emissions from five lakes and associated wetlands of the Colorado Rockies. *Global Biogeochem Cycles* **6**: 323–338.
- Smith, P.F., Langworthy, T.A., and Smith, M.R. (1975) Polypeptide nature of growth requirement in yeast extract for *Thermoplasma acidophilum*. *J Bacteriol* **124**: 884–892.
- Smith, R.L., Howes, B.L., and Garabedian, S.P. (1991) In situ measurement of methane oxidation in groundwater by using natural-gradient tracer tests. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1997–2004.
- Snyder, J.C., and Young, M.J. (2011) Advances in understanding archaea-virus interactions in controlled and natural environments. *Curr Opin Microbiol* **14**: 497–503.
- Snyder, J.C., Bolduc, B., Bateson, M.M., and Young, M.J. (2011a) The prevalence of STIV c92-like proteins in acidic thermal environments. *Advances in Virology*: doi:10.1155/2011/650930.
- Snyder, J.C., Brumfield, S.K., Peng, N., She, Q., and Young, M.J. (2011b) Sulfolobus turreted icosahedral virus c92 protein responsible for the formation of pyramid-like cellular lysis structures. *J Virol* **85**: 6287–6292.
- Sohngen, N.L. (1906) Über bakterien welche methan ab kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen (Les bactéries qui utilisent le méthane comme source d'énergie et de carbone). *Z Bakteriell Parazitenk (Infektionster)* **15**: 513–517.
- Solomon, S. (2007) *Climate change 2007: the physical science basis*. Cambridge: Cambridge University Press
- Sørensen, K.B., and Teske, A. (2006) Stratified communities of active archaea in deep marine subsurface sediments. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4596–4603
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattei, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. et al. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* **18**: 331–340.
- Springer, E., Sachs, M.S., Woese, C.R., and Boone, D.R. (1995) Partial gene sequences for the a subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 554–559.
- Stackebrandt, E., and Goebel, B.M. (1994) A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s Ribosomal-Rna Sequence-Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846–849.
- Staden, R. (1996) The Staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* **5**: 233–241.
- Stams, A.J.M., and Plugge, C.M. (2009) Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **7**: 568–577.
- Stebich, M., Bruchmann, C., Kulbe, T., and Negendank, J.F.W. (2005) Vegetation history, human impact and climate change during the last 700 years recorded in annually laminated

- sediments of Lac Pavin, France. *Rev Palaeobot Palynol* **133**: 115-133.
- Stein, L.Y., La Duc, M.T., Grundl, T.J., and Nealson, K.H. (2001) Bacterial and archaeal populations associated with freshwater ferromanganous micronodules and sediments. *Environ Microbiol* **3**: 10-18.
- Steinberg, L.M., and Regan, J.M. (2009) mcrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR method to examine methanogen communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4435-4442.
- Stoecker, K., Bendinger, B., Schoning, B., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Baranyi, C., Toenshoff, E.R., Daims, H., and Wagner, M. (2006) Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2363-2367.
- Summons, R.E., Franzmann, P.D., and Nichols, P.D. (1998) Carbon isotopic fractionation associated with methylo-trophic methanogenesis. *Org Geochem* **28**: 465-475.
- Sundh, I., Bastviken, D., and Tranvik, L.J. (2005) Abundance, activity, and community structure of pelagic methane-oxidizing bacteria in temperate lakes. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6746-6752.
- Suttle, C.A. (2005) Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356-361.
- Suttle, C.A. (2007) Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* **5**: 801-812.
- Swan, B.K., Ehrhardt, C.J., Reifel, K.M., Moreno, L.I., and Valentine, D.L. (2010) Archaeal and bacterial communities respond differently to environmental gradients in anoxic sediments of a California hypersaline lake, the Salton Sea. *Appl Environ Microbiol* **76**: 757-768.
- Sweerts, J.P.R.A., Bar-Gilissen, M.J., Cornelese, A.A., and Cappenberg, T.E. (1991) Oxygen-consuming processes at the profundal and littoral sediment-water interface of a small meso-eutrophic lake (Lake Vechten, The Netherlands). *Limnol Oceanogr* **36**: 1124-1133.
- Taipale, S., Jones, R.I., and Tirola, M. (2009) Vertical diversity of bacteria in an oxygen-stratified humic lake, evaluated using DNA and phospholipid analyses. *Aquat Microb Ecol* **55**: 1-16.
- Takai, K., Moser, D.P., DeFlaun, M., Onstott, T.C., and Fredrickson, J.K. (2001) Archaeal diversity in waters from deep South African gold mines. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5750-5760.
- Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Nomaki, H., Morono, Y., Inagaki, F., Kitazato, H., Hinrichs, K.U., and Ohkouchi, N. (2010) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nat Geosci* **3**: 858-861.
- Tamaoka, J., and Komagata, K. (1984) Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol Lett* **25**: 125-128.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*: doi: 10.1093/molbev/msr1121.
- Teske, A., and Sorensen, K.B. (2008) Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: have we caught them all? *ISME J* **2**: 3-18.
- Thauer, R., Zinkhan, D., and Spormann, A. (1989) Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **43**: 43-67.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Thauer, R.K. (2011) Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of

- the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. *Curr Opin Microbiol* **14**: 292-299.
- Thauer, R.K., and Shima, S. (2008) Methane as fuel for anaerobic microorganisms. *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 158-170.
- Thingstad, T., and Lignell, R. (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat Microb Ecol* **13**: 19-27.
- Thingstad, T., Heldal, M., Bratbak, G., and Dundas, I. (1993) Are viruses important partners in pelagic food webs? *Trends Ecol Evol* **8**: 209-213.
- Thingstad, T.F. (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol Oceanogr* **45**: 1320-1328.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tornabene, T.G., and Langworthy, T.A. (1979) Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* **203**: 51-53.
- Torsvik, T., and Dundas, I.D. (1974) Bacteriophage of *Halobacterium salinarum*. *Nature* **248**: 680-681.
- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M. et al. (2011) *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 8420-8425
- Tranvik, L.J., Downing, J.A., Cotner, J.B., Loiselle, S.A., Striegl, R.G., Ballatore, T.J., Dillon, P., Finlay, K., Fortino, K. et al. (2009) Lakes and reservoirs as regulators of carbon cycling and climate. *Limnol Oceanogr* **54**: 2298-2314.
- Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* **7**: 1985-1995.
- Trotsenko, Y.A., and Murrell, J.C. (2008) Metabolic aspects of aerobic obligate methanotrophy. *Adv Appl Microbiol* **63**: 183-229.
- Tsutsumi, M., Iwata, T., Kojima, H., and Fukui, M. (2010) Spatiotemporal variations in an assemblage of closely related planktonic aerobic methanotrophs. *Freshw Biol* **56**: 342-351.
- Twort, F.W. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet* **186**: 1241-1243.
- Urrutia, M.M., Roden, E.E., and Zachara, J.M. (1999) Influence of aqueous and solid-phase Fe (II) complexants on microbial reduction of crystalline iron (III) oxides. *Environ Sci Technol* **33**: 4022-4028.
- Utsumi, M., Nojiri, Y., Nakamura, T., Nozawa, T., Otsuki, A., and Seki, H. (1998a) Oxidation of dissolved methane in a eutrophic, shallow lake: Lake Kasumigaura, Japan. *Limnol Oceanogr* **43**: 471-480.
- Utsumi, M., Nojiri, Y., Nakamura, T., Nozawa, T., Otsuki, A., Takamura, N., Watanabe, M., and Seki, H. (1998b) Dynamics of dissolved methane and methane oxidation in dimictic Lake Nojiri during winter. *Limnol Oceanogr* **43**: 10-17.
- Valas, R., and Bourne, P. (2011) The origin of a derived superkingdom: how a gram-positive bacterium crossed the desert to become an archaeon. *Biol Direct* **6**: 16.
- Valentine, D.L. (2002) Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie Leeuwenhoek* **81**: 271-282.

- Valentine, D.L. (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat Rev Microbiol* **5**: 316-323.
- van Bodegom, P.M., Scholten, J.C.M., and Stams, A.J.M. (2004) Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 261-268.
- van der Wielen, P.W.J.J., Bolhuis, H., Borin, S., Daffonchio, D., Corselli, C., Giuliano, L., D'Auria, G., de Lange, G.J., Huebner, A. et al. (2005) The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* **307**: 121-123.
- Vetriani, C., Tran, H.V., and Kerkhof, L.J. (2003) Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6481-6488.
- Vetriani, C., Jannasch, H.W., MacGregor, B.J., Stahl, D.A., and Reysenbach, A.L. (1999) Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic archaea in deep-sea sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4375-4384.
- Viollier, E., Michard, G., Jézéquel, D., Pèpe, M., and Sarazin, G. (1997) Geochemical study of a crater lake: Lake Pavin, Puy de Dôme, France. Constraints afforded by the particulate matter distribution in the element cycling within the lake. *Chem Geol* **142**: 225-241.
- Vorobev, A.V., Baani, M., Doronina, N.V., Brady, A.L., Liesack, W., Dunfield, P.F., and Dedys, S.N. (2010) *Methyloferula stellata* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, obligately methanotrophic bacterium possessing only a soluble methane monooxygenase. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2456-2463.
- Wais, A., Kon, M., MacDonald, R., and Stollar, B. (1975) Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*.
- Walter, K., Zimov, S., Chanton, J.P., Verbyla, D., and Chapin, F.S. (2006) Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming. *Nature* **443**: 71-75.
- Wand, U., Samarkin, V.A., Nitzsche, H.M., and Hubberten, H.W. (2006) Biogeochemistry of methane in the permanently ice-covered Lake Untersee, central Dronning Maud Land, East Antarctica. *Limnol Oceanogr* **51**: 1180-1194.
- Wang, H., Lu, J., Wang, W., Yang, L., and Yin, C. (2006) Methane fluxes from the littoral zone of hypereutrophic Taihu Lake. *J Geophys Res* **111**: doi:10.1029/2005JD006864
- Wang, J.S., Logan, J.A., McElroy, M.B., Duncan, B.N., Megretskaia, I.A., and Yantosca, R.M. (2004) A 3-D model analysis of the slowdown and interannual variability in the methane growth rate from 1988 to 1997. *Global Biogeochem Cycles* **18**: doi:10.1029/2003GB002180, 002004.
- Wang, Z., Keppler, F., Greule, M., and Hamilton, J.T.G. (2011) Non-microbial methane emissions from fresh leaves: effects of physical wounding and anoxia. *Atmos Environ* **45**: 4915-4921.
- Ward, J.H. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J Amer Statistical Assoc* **58**: 236-244.
- Wartiainen, I., Hestnes, A.G., and Svenning, M.M. (2003) Methanotrophic diversity in high arctic wetlands on the islands of Svalbard (Norway)-denaturing gradient gel electrophoresis analysis of soil DNA and enrichment cultures. *Can J Microbiol* **49**: 602-612.
- Wartiainen, I., Hestnes, A.G., McDonald, I.R., and Svenning, M.M. (2006) *Methylobacter tundripaludum* sp nov., a methane-oxidizing bacterium from Arctic wetland soil on the Svalbard islands, Norway (78 degrees N). *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 109-113.
- Webster, G., Sass, H., Cragg, B.A., Gorra, R., Knab, N.J., Green, C.J., Mathes, F., Fry, J.C., Weightman, A.J. et al. (2011) Enrichment and cultivation of prokaryotes associated with the sulphate methane transition zone of diffusion controlled sediments of Aarhus Bay, Denmark under heterotrophic conditions. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 248-263.

- Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 127-181.
- Weinbauer, M.G., and Rassoulzadegan, F. (2004) Are viruses driving microbial diversification and diversity? *Environ Microbiol* **6**: 1-11.
- Werner, F. (2007) Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Mol Microbiol* **65**: 1395-1404.
- Whiticar, M.J. (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem Geol* **161**: 291-314.
- Whitman, W., and Jeanthon, C. (2006) Methanococcales. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Whitman, W., and Jeanthon, C. (eds): Springer New York, pp. 257-273.
- Whitman, W., Bowen, T., and Boone, D. (2006) The Methanogenic Bacteria. In *The prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Whitman, W. et al. (eds): Springer New York, pp. 165-207.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578-6583
- Widdel, F., Boetius, A., and Rabus, R. (2006) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. *The prokaryotes* **2**: 1028-1049.
- Wilhelm, S.W., and Suttle, C.A. (1999) Viruses and nutrient cycles in the sea. *Bioscience* **49**: 781-788.
- Winfrey, M.R., and Zeikus, J.G. (1977) Effect of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* **33**: 275-281.
- Winfrey, M.R., and Zeikus, J.G. (1979) Microbial methanogenesis and acetate metabolism in a meromictic lake. *Appl Environ Microbiol* **37**: 213-221.
- Winget, D.M., and Wommack, K.E. (2008) Randomly amplified polymorphic DNA PCR as a tool for assessment of marine viral richness. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2612-2618.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* **51**: 221-271.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090.
- Woese, C.R., and Olsen, G.J. (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst Appl Microbiol* **7**: 161-177.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4576-4579.
- Woese, C.R., Fox, G.E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., Lewis, B.J., and Stahl, D. (1975) Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* **254**: 83-86.
- Wolfe, R.S. (1993) An historical overview of methanogenesis. In *Methanogenesis: ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Ferry, J.G. (ed). New York: Chapman and Hall, pp. 1-33.
- Wolin, M. (1974) Metabolic interactions among intestinal microorganisms. *Am J Clin Nutr* **27**: 1320-1328.
- Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 69-114.
- Wood, A.G., Whitman, W.B., and Konisky, J. (1989) Isolation and characterization of an archaeobacterial viruslike particle from *Methanococcus voltae* A3. *J Bacteriol* **171**: 93-98.
- Wu, X.L., Friedrich, M.W., and Conrad, R. (2006) Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils. *Environ Microbiol* **8**: 394-404.

- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., Van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J. et al. (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12317-12322.
- Xiang, X., Chen, L., Huang, X., Luo, Y., She, Q., and Huang, L. (2005) *Sulfolobus tengchongensis* spindle-shaped virus STSV1: virus-host interactions and genomic features. *J Virol* **79**: 8677-8686.
- Yashiro, Y., Sakai, S., Ehara, M., Miyazaki, M., Yamaguchi, T., and Imachi, H. (2009) *Methanoregula formica* sp. nov., a novel methane-producing archaeon isolated from methanogenic sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 53-59.
- Ye, W.J., Liu, X.L., Lin, S.Q., Tan, J., Pan, J.L., Li, D.T., and Yang, H. (2009) The vertical distribution of bacterial and archaeal communities in the water and sediment of Lake Taihu. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 263-276.
- Zachara, J.M., Fredrickson, J.K., Li, S.M., Kennedy, D.W., Smith, S.C., and Gassman, P.L. (1998) Bacterial reduction of crystalline Fe (super 3+) oxides in single phase suspensions and subsurface materials. *American Mineralogist* **83**: 1426-1443.
- Zehnder, A.J.B., and Brock, T.D. (1979) Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol* **137**: 420-432.
- Zehnder, A.J.B., and Brock, T.D. (1980) Anaerobic methane oxidation - occurrence and ecology. *Appl Environ Microbiol* **39**: 194-204.
- Zeikus, J.G., and Winfrey, M.R. (1976) Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol* **31**: 99-107.
- Zhang, G., Tian, J., Jiang, N., Guo, X., Wang, Y., and Dong, X. (2008) Methanogen community in Zoige wetland of Tibetan plateau and phenotypic characterization of a dominant uncultured methanogen cluster ZC I. *Environ Microbiol* **10**: 1850-1860.
- Zhang, Y., Maignien, L., Zhao, X., Wang, F., and Boon, N. (2011) Enrichment of a microbial community performing anaerobic oxidation of methane in a continuous high-pressure bioreactor. *BMC Microbiol* **11**: 137-145.
- Zhou, J., Bruns, M.A., and Tiedje, J.M. (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* **62**: 316-322.
- Zhu, J., Liu, X., and Dong, X. (2011) *Methanobacterium movens* sp. nov. and *Methanobacterium flexile* sp. nov., isolated from lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 2974-2978.
- Zinder, S.H. (1993) Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis*. Ferry, J.G. (ed), pp. 128-206.
- Zinder, S.H., and Brock, T.D. (1978) Production of methane and carbon dioxide from methane thiol and dimethyl sulfide by anaerobic lake-sediments. *Nature* **273**: 226-228.
- Zuckerkandl, E., and Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* **8**: 357-366.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ANOSIM : ANalyse Of SIMilarity.

AOM : Anaerobic Methane Oxidation (= OAM en français).

ARNr : ARN ribosomique.

ARNr 16S : ARN de la petite sous-unité du ribosome chez les procaryotes.

ARNr 18S : ARN de la petite sous-unité du ribosome chez les eucaryotes.

ATP : Adenosine triphosphate.

BFR : Bactéries Ferro-Réductrices.

cDNA : complementary DNA.

CITD : Carbone Inorganique Total Dissous.

COD : Carbone Organique Dissous (= DOC en anglais).

CoM : Co-enzyme M ; cofacteur impliqué dans la méthanogenèse.

COTD : Carbone Organique Total Dissous.

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole ; molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN. Elle possède un maximum d'absorption à 358 nm (ultra-violet) et émet à 461 nm (bleu).

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.

DNA : DeoxyriboNucleic Acid.

DO : Dissolved Oxygen.

DOC : Dissolved Organic Carbon (= COD en français).

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (un des plus grand centre de ressources biologiques au monde).

FIC : Frequency of Infected Cells.

FISH : Fluorescence *In Situ* Hybridization.

FVIC : Frequency of Visibly Infected Cells.

gDNA : genomic DNA.

ICM : IntraCytoplasmic Membrane

LUCA : Last Universal Common Ancestor.

MCR : methyl-coenzyme M reductase ; partagé par toute les méthanogènes, ce complexe enzymatique est impliqué dans la dernière étape de la méthanogenèse.

mcrA : gène codant pour la sous-unité α de la MCR ; utilisé comme marqueur fonctionnel pour étudier l'abondance et la diversité des méthanogènes et des méthanotrophes anaérobies (ANME).

MDS : Multidimensional Scaling Plot.

MET : Microscope Electronique à Transmission (= TEM en anglais).

MMO : Methane MonoOxygnase ; enzyme réalisant la première étape de l'oxydation aérobie du méthane en méthanol. Il existe deux formes de cette enzyme, la forme soluble, sMMO, et la forme particulière, pMMO.

MPR : Methane Production Rate.

NDMO : Nitrite Dependent Methane Oxidation.

OAM : Oxydation Anaérobie du Methane (= AOM en anglais).

OC : Organic Carbon.

OM : Organic Matter.

OTU : Operational Taxonomic Unit.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PEG : PolyEthylene Glycol.

PFLA : Phospholipid Fatty Acid.

pMMO : forme particulaire de l'enzyme MMO.

pmoA : gène codant pour la sous-unité α de la MMO ; utilisé comme marqueur fonctionnel pour étudier l'abondance et la diversité des méthanotrophes aérobies.

ppb : part per billion (milliard).

ppm : part per million.

Q_{10} : le taux de changement d'un processus lié à une augmentation de la température de 10°C.

qPCR : quantitative PCR.

RAPD : Random Amplification Polymorphism DNA.

RNA : RiboNucleic Acid.

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction.

SDMO : Sulfate Dependent Methane Oxydation.

SEM : Scanning Electron Microscope.

sMMO : forme soluble de l'enzyme MMO.

SRB : Sulfate Reducing Bacteria.

TEM : Transmission Electron Microscope (= MET en français).

Tg : Tégragramme (= 1 million de tonnes).

TOC : Total Organic Carbon.

TTGE : Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis.

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean.

VBM : Viral induced Bacterial Mortality.

VLP : Virus Like Particle.

VPR : Virus to Prokaryotes Ratio.

Lignées candidates (affiliations, arc = *Archaea*, eury = *Euryarchaeota*, cre = *Crenarchaeota*, thaum = *Thaumarchaeota* et bac = *Bacteria*) :

AAA (arc, eury) : AOM-Associated *Archaea* ; Archées notamment rencontrées dans des environnements où la NDMO a lieu. Ces archées possèdent très probablement le gène *mcrA*. Elles pourraient être méthanogènes et/ou méthanotrophes.

ANME (arc, eury) : ANaerobic Methanotrophs ; 3 clades distincts d'ANME sont reconnus et notés ANME-I, -II, et -III. Les archées affiliées à ces groupes sont impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane, principalement en milieu marin ou géothermal.

DSEG (arc, eury) : Deep Sediment Euryarchaeotal Group.

LDS (arc, eury) : Lake Dagow Sediments ; Une des lignées candidates d'archées dominante dans les lacs d'eau douce.

MBG-D (arc, eury) : Marine Benthic Group-D ; Lignée candidate d'archées souvent présente dans les sédiments, indépendamment du pourcentage de salinité.

MCG (arc, cre/thaum) : Miscellaneous Crenarchaeotal Group ; lignée représentant potentiellement un nouveau phylum d'archées, ubiquiste en milieux pelagique comme benthique, indépendamment du pourcentage de salinité, ainsi que dans les sols.

MG-I (arc, thaum) : Marine Group I ; la majeure partie de ses représentants sont impliqués dans l'oxydation de l'ammonium.

MSBL1 (arc, eury) : Mediterranean Sea Brine Lakes group 1. Regroupe potentiellement des méthanogènes halophiles.

Mx (arc, eury) : Lignée contenant les clones nommés "Mx" par Mihajlovski *et al.*, (2008 ; 2010) ; correspond à TPM / NO et représente potentiellement un nouvel ordre de méthanogènes ou de méthanotrophes anaérobies.

NC10 (bac) : Nullarbor Caves 10 ; division candidate contenant des bactéries impliquées dans l'oxydation anaérobie du méthane couplée à la dénitrification. Contient l'espèce "*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*".

NO (arc, eury) : Novel Order ; s'apparente à Mx et TPM.

OD1 (bac) : OP11 derived 1.

OP11 (bac) : Obsidian Pool 11.

RC-V (arc, eury) : Rice Cluster-V ; Une des lignées candidates d'archées dominante dans les lacs d'eau douce.

SR1 (bac) : Sulfur River I.

TMEG (arc, eury) : Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group.

TPM (arc, eury) : *Thermoplasmatales* Potentiellement Méthanogènes/méthanotrophes ; s'apparente à Mx / NO.

ZC-I (arc, eury) : Zoid Cluster-I ; cultivé à partir d'une tourbière ; la caractérisation de cet enrichissement suggère que cette lignée est composée de méthanogènes méthylotrophes. D'un point de vue phylogénétique, selon la comparaison des séquences d'ARNr16S et *mcrA*, cette lignée correspond à la lignée AAA.

Virus d'archées :

SNDV : *Sulfolobus neozealandicus* droplet-shaped virus

ABV : *Acidianus* bottle-shaped virus

AFV1 : *Acidianus* Filamentous Virus 1

SIRV2 : *Sulfolobus islandicus* Rod Shaped Virus 2

HRPV1 : *Halorubrum* pleomorphic virus 1

ATV : *Acidianus* two-tailed virus

SSV1 : *Sulfolobus* spindle-shaped virus 1: 296

His2 : *Haloarcula hispanica* virus 2

PSV : *Pyrobaculum* spherical virus

φ F1 : *Methanothermobacter thermoautotrophicus* virus 1

φ F3 : *Methanothermobacter thermoautotrophicus* virus 3

ψ M1 : *Methanothermobacter marburgensis* virus 1

ψ M2 : *Methanothermobacter marburgensis* virus 2

PG : *Methanobrevibacter smithii* strain G virus

PMS1 : *Methanobrevibacter smithii* virus

MMV : *Methanofollis aquaemaris* putative virus

INDEX DES ILLUSTRATIONS

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Comparaison d'attributs biochimiques, métaboliques et physiologiques entre *Bacteria*, *Archaea* et *Eukarya*. Ces traits sont établis pour la grande majorité des organismes affiliés à ces domaines, néanmoins certaines exceptions existent. Par exemple, les haloarchaea possèdent souvent des organelles sous forme de vésicules de gaz, mais la plupart des archaea ne possèdent pas d'organelles, d'après Cavicchioli (2010).

Tableau 2 : Voies cataboliques de l'acétate et enthalpie libre standard (ΔG°) associée à ces voies. Dans les environnements non-extrêmes, la seule voie catabolique de l'acétate connue pour les archées, la méthanogenèse acétoclastique, est la voie la moins énergétique, d'après Thauer *et al.*, (1989).

Tableau 3 : Liste des virus de méthanogènes isolés. En noir, les virus de méthanogènes thermophiles ; en bleu, les virus de méthanogènes mésophiles, adapté de Prangishvili *et al.*, (2006b).

Tableau 4 : Emission (E), consommation (C), et production (P) globales nettes de CH₄ par les sources naturelles ou anthropiques. Exprimé en Téragramme (Tg) de méthane par an ($E + C = P$)^f, d'après Reeburgh (2007).

Table 5: Occurrence of methanogenic genera and distribution of methanogen sequences belonging to these genera in freshwater lakes. This analysis was performed based on data from 19 freshwater lakes and 468 archaeal 16S rRNA sequences. Sequences were first aligned with sequences of cultivated methanogens belonging to all methanogen genera. Phylogenetic trees were constructed and 275 sequences affiliated with or closely related to methanogen orders were kept. These sequences were compared using Blast2n software optimized for highly similar sequences (megablast) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) to their closest isolated species. A sequence exhibiting 95% similarity with a sequence of a cultivated species was affiliated with the same genus, whereas others were classified as “not affiliated with any known methanogen genera”. In case of possible affiliation to two genera, sequences were affiliated with the genera of the most similar sequences of cultivated species. The affiliations of environmental sequences with genera were confirmed by phylogenetic analyses.

Table 6: Occurrence of genera of aerobic methanotrophs and distribution of methanotroph sequences belonging to these genera in freshwater lakes. This analysis, performed on data from 7 freshwater lakes and 73 16S rRNA sequences, was realized as described for methanogens, except that a 96% cutoff was applied for genus affiliation. de l'ARN ribosomal, d'après Woese (1990).

Figure 1 : Premier arbre phylogénétique représentant les 3 domaines du vivant, basé sur les séquences

Figure 2 : Diagramme de Venn illustrant la distribution générale des familles de protéines ribosomales entre les trois domaines : Bacteria (B), Archaea (A), Eucarya (E). Le nombre de familles est indiqué sous chaque ensemble, d'après Lecompte *et al.*, (2002).

Figure 3 : Propriétés des lipides et des membranes des archées (à gauche), des bactéries (à droite). Les membranes des eucaryotes sont semblables à celles des bactéries. La flèche située sous les membranes indique la tendance générale d'augmentation de la perméabilité de ces membranes au passage d'ions tels que les protons ou le sodium, d'après Valentine (2007).

Figure 4 : Diversité morphologique et phylogénie des archaea intégrant les lignées ne contenant pas de représentant cultivé. L'arbre, adapté de Schleper *et al.*, (2005), a été modifié pour indiquer les *Thaumarchaeota* (en vert) et les lignées dont l'affiliation phylogénique, entre *Crenarchaeota* et *Thaumarchaeota*, est incertaine (en orange) (Pester *et al.*, 2011). La position phylogénétique des

Thaumarchaeota parmi les *Archaea* est encore incertaine (cf. Figure 5). Les lignées en rouge sont affiliées aux *Crenarchaeota*, les lignées en violet aux *Korarchaeota* et les lignées en bleu aux *Euryarchaeota*. Les lignées foncées dont les noms portent un astérisque contiennent des souches cultivées. Pour chaque lignée, un exemple de morphotype est proposé.

Figure 5 : Arbre non enraciné présentant la phylogénie de 99 archées dont le génome a été séquencé. L'analyse est basée sur la concaténation de 57 protéines ribosomiques présentes dans 89 des 99 génomes séquencés, d'après Brochier-Armanet *et al.*, (2011).

Figure 6 : Illustration du rôle des archées dans les cycles biogéochimiques globaux. La contribution des archées aux cycles globaux est indiquée par le nom des voies métaboliques qu'elles mettent en œuvre et par les lignées d'archées impliquées dans ces voies. Les astérisques indiquent les voies pour lesquelles les archées jouent un rôle majeur, d'après Jarrell *et al.*, (2011).

Figure 7 : Régression multivariée entre le nombre de séquences de lignées d'archées et les paramètres environnementaux suivants : habitats (sol, lac, océan, colonne d'eau, sédiment), salinité, concentration en oxygène et température. Le modèle explique 37% de la variance de l'ensemble du jeu de données. Les diagrammes situés à l'extrémité de chaque branche représentent la moyenne normalisée de l'abondance des lignées pour chaque lignée significativement corrélée aux paramètres environnementaux, d'après Auguet *et al.*, (2010).

Figure 8 : Courbes de raréfaction illustrant la diversité des *Archaea* dans les habitats suivants : colonnes d'eau dulçaquicoles (Fwc), cheminées hydrothermales (Hdv), sédiments marins (Msd), colonnes d'eau hypersalines (Hsal), sédiments de milieux dulçaquicoles (Fsed), colonnes d'eau de milieux marins (Mwc), sols (S). Le seuil de discrimination des OTUs (Operational Taxonomic Unit) est de 97% de similarité, d'après Auguet *et al.*, (2010).

Figure 9 : A) Phylogénie du gène *mcrA* établissant les relations entre archées méthanogènes/méthanotrophes. B) Phylogénie de l'ARNr 16S d'*Euryarchaeota*. Les séquences en gras ont été obtenues dans Mihajlovski *et al.*, (2010). Arbres, d'après Mihajlovski *et al.*, (2010).

Figure 10 : Fixation du N₂ (marqué au ¹⁵N) au sein d'un consortia entre ANME-2 (en rouge sur la photo de gauche) et bactéries sulfato-réductrices (*Desulfosarcina*, en vert sur la photo de gauche). Les couleurs claires sur la photo de droite (obtenue en microscopie ionique) correspondent à un ratio ¹⁵N/¹⁴N élevé indiquant la fixation de l'azote. La co-localisation d'un ratio ¹⁵N/¹⁴N élevé et des ANME montre que ces organismes sont capables de fixer l'azote atmosphérique, d'après Dekas *et al.*, (2009).

Figure 11 : Analyse ultrastructurale, optique et hybridation fluorescente *in-situ* de *Candidatus Giganthauma karukerense* et *Candidatus Giganthauma insulaporcus*, d'après Muller *et al.*, (2010).

- A. Observation en microscopie optique de filaments de *Candidatus G. karukerense* / *G. insulaporcus* sur des bois coulés de mangrove.
- B. Observation en microscopie électronique à transmission d'une section transversale de *Candidatus G. insulaporcus* et *Candidatus G. karukerense*.
- C. Hybridation positive de *Candidatus G. insulaporcus* avec la sonde Arch 915.
- D. Double hybridation montrant *Candidatus G. karukerense* (marqué avec la sonde archGK) et son potentiel ecto-symbionte bactérien (marqué avec la sonde bacGK).
- E. Observation en microscopie électronique à balayage de *Candidatus G. karukerense* et *G. insulaporcus*.
- F. et G. Variations de la densité et du nombre d'ecto-symbiontes bactériens (potentiellement thio-autotrophes).

Figure 12 : (A) Les différents types de cycles de vie des virus. (B) Attachement d'un virus à une cellule hôte et injection du matériel génétique. (C) multiplication des virus dans la cellule. (D) libération des virus lors du cycle lytique. (A) D'après Weinbauer (2004), (C-D) photos J. Colombet.

Figure 13 : Schématisation du réseau trophique en milieu aquatique pélagique et abondance des différentes communautés microbiennes selon le niveau trophique, d'après Amblard *et al.*, (1998).

Figure 14 : Influence des virus sur le cycle du carbone en milieu marin (shunt viral). Les valeurs correspondent aux flux de carbone fixé au cours de la photosynthèse (100%). Le modèle se fonde sur les hypothèses suivantes : (1) tout le carbone est respiré et la perte due à l'export est négligeable. (2) le carbone organique dissous (COD) est bio-disponible pour les bactéries. La lyse virale libère dans le milieu des virions et du COD détournant ainsi 6 à 26 % du flux de carbone vers les consommateurs secondaires, d'après le modèle de Wilhem et Suttle (1999), diagramme repris dans Berdjeb et Jacquet (2009).

Figure 15 : Schéma conceptuel résumant les actions potentielles des virus sur la diversité des procaryotes, d'après Weinbauer et Rassoulzadegan (2004), repris dans Berdjeb et Jacquet (2009).

Figure 16 : Transfert génétique horizontal (transformation (A) et transduction (B)) chez les bactéries via l'infection et la lyse virale, d'après Port (2008), repris dans Berdjeb et Jacquet (2009).

Figure 17 : Variabilité morphotypique des virus d'archées isolés. (les barres d'échelle représentent 100 nm). Familles/genres des virus ϕ F1: Myoviridae, ϕ F3: Siphoviridae (Nolling *et al.*, 1993), SNDV: Guttaviridae (Arnold *et al.*, 2000), ABV: Ampullaviridae (Haring *et al.*, 2005), AFV1: Lipothrixviridae (Bettstetter *et al.*, 2003), SIRV2: Rudiviridae (Arnold *et al.*, 2000), HRPV1: famille non définie (Pietilla *et al.*, 2009), ATV: Bicaudaviridae (Haring *et al.*, 2005b), SSV1: Fuselloviridae (Palm *et al.*, 1991), His2: Salterprovirus (Bath *et al.*, 2006), PSV: Globuloviridae (Haring *et al.*, 2004).

Figure 18 : Répartition des familles virales entre les 3 domaines du vivant. Les familles de virus listées sont approuvées par le Comité International sur la Taxonomie des Virus, à l'exception de celles entre guillemets pour lesquelles les noms sont proposés mais non encore approuvés, d'après Prangishvili *et al.*, (2006a).

Figure 19 : Les VAPs (Virus-induced Pyramidal Formation) constituent un mécanisme de libération des virus uniquement rencontré dans le domaine des *Archaea*. Deux espèces virales infectant *Sulfolobus islandicus* sont connues pour former ces structures, STIV et SIRV2. (A) Visualisation en microscopie électronique à balayage des VAPs formées par STIV et en microscopie électronique à transmission sur des coupes fines des VAPs formées par SIRV2 fermées (B et C) et ouvertes (D), (A) d'après Snyder *et al.*, (2011) et (B-D) de Quax *et al.*, (2011).

Figure 20 : Diversité morphotypique de potentielles particules virales encore non isolées. Les photos A₂, C₂, B₂, F₁ sont tirées de Sime-Ngando *et al.*, (2011) et les photos I et J de Rachel *et al.*, (2002).

Figure 21 : Cellules d'archées carrées (de type *Haloquadratum* spp.) infectées par des virus, d'après Guixa-Boixareu *et al.*, (1996).

Figure 22 : Potentielles particules virales ayant une forme proche de morphotypes de virus d'archées. Forme typique des bicaudavirus, observée dans des sédiments estuariens saumâtres (A, flèche bleue) et forme typique des fusellovirus, observée dans un lac d'eau douce d'Antarctique (B). Un grossissement sur d'éventuels filaments terminaux (pointés par des flèches oranges) est affiché en bas à gauche de chaque photo, (A) d'après Middelboe *et al.*, (2003) et (B) d'après López-Bueno *et al.*, (2009).

Figure 23 : Schéma du cycle du carbone soulignant le rôle du méthane comme intermédiaire métabolique et représentant les principales voies métaboliques impliquées dans sa production et sa consommation, d'après Thauer (2011).

Figure 24 : Représentation en trois dimensions d'une molécule de méthane.

Figure 25 : L'expérience d'Alessandro Volta représentée par un artiste de l'époque. A droite, le dessin montre une bougie éteinte au fond de la flasque, illustrant la nécessité d'un contact avec l'air pour la combustion. Gravure d'époque, reprise de Wolfe (1993).

Figure 26 : Concentrations atmosphériques des principaux gaz à effet de serre de l'an 0 à l'an 2000. Les concentrations sont indiquées en partie par million (ppm) ou par milliard (ppb), indiquant le nombre de molécules de gaz à effet de serre par million ou milliard de "molécules d'air", d'après Solomon (2007).

Figure 27 : Contribution des sources de méthane au bilan atmosphérique total (500-600 Tg de méthane par an), d'après Conrad (2009).

Figure 28 : Estimation des émissions annuelles de méthane et d'oxyde nitreux à partir de sources naturelles, en Tégragramme (Tg, 10^{12} g) par an. D'après le rapport 2009 de l'EPA (United States Environmental Protection Agency). L'estimation des émissions de méthane à partir des lacs est basée sur l'estimation de Bastviken *et al.*, (2004).

Figure 29 : Représentation schématique du rôle des systèmes aquatiques continentaux dans l'équilibre du carbone global. Représentation passée des systèmes aquatiques continentaux considérée majoritairement en tant que voie de transport du carbone d'origine terrestre vers les océans (a). Représentation du rôle de ces systèmes dans le stockage et l'émission atmosphérique de carbone basée sur les estimations de Cole *et al.*, (2007) (b) et de Tranvik *et al.*, (2009) (c). Les valeurs sont données en Pétagramme de carbone par an. (a) et (b) d'après Cole *et al.*, (2007) et (c) d'après Tranvik *et al.*, (2009).

Figure 30 : Voies de transport du méthane dans les lacs. 1) L'ébullition, 2) Le stockage en période de stratification thermique qui mène à d'importantes émissions en période de brassage, 3) La diffusion, 4) Le transport par l'aérenchyme (photo MET) des macrophytes. Le diagramme en haut à gauche représente la probabilité d'ébullition en fonction de la hauteur de la colonne d'eau. Les mécanismes de stockage et d'émission du méthane lié à la stratification (été) et au brassage (automne) sont représentés en bas du schéma, modifié d'après Bastviken (2009).

Figure 31: Methanogen and methanotroph strains cultivated from Lake Pavin A) Phase-contrast micrograph of *Methanosarcina* sp. from sediments; B) the same field, autofluorescence of cofactor F₄₂₀ of methanogens is revealed by lightening at 420 nm; C) electron micrographs of *Methanobacterium* sp. strain 17A1^T isolated from sediments; and D) Methylocystis sp. aggregated in exopolymers, isolated from a water column.

Figure 32 : Phylogenetic tree illustrating relationships between the six methanogenic orders, the three ANME lineages and the AAA (AOM-associated archaea), all belonging to the archaeal domain. 16S rRNA sequences were recovered from cultivated strains for methanogens and from an environmental clone library for ANMEs and AAA. Sequences of type strains isolated from freshwater lakes are underlined. Sequences in bold have more than 97% similarity with at least one environmental sequence from freshwater lakes (analysis carried out on 468 archaeal sequences retrieved from 19 freshwater lakes). Phylogenetic analyses were performed with MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). Evolutionary history was inferred using the neighbor joining method (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap values greater than 50% derived from 1000 replicates are indicated. Tree is rooted with *Cenarchaeum symbiosum*.

Figure 33 : Phylogenetic tree illustrating relationships between the four families of aerobic methanotrophs and anaerobic methanotroph ‘*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*’ (division NC10), all belonging to the bacterial domain. 16S rRNA sequences were recovered from cultivated strains of all known genera. Sequences of strains isolated from freshwater lakes are underlined. Sequences in bold have more than 97% similarity with at least one environmental sequence from freshwater lakes (analysis carried out on 73 bacterial sequences retrieved from 7 freshwater lakes). Phylogenetic analyses were performed with MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). The evolutionary history was inferred using the neighbor joining method (Saitou and Nei, 1987). Bootstrap values greater than 50% derived from 1000 replicates are indicated. Tree is rooted with *Aquifex aeolicus*.

PRESENTATION DU SITE D’ETUDE

Figure 1 : A) Photographie aérienne du Lac Pavin (Photo : Joel Damase). B) Carte bathymétrique du Lac Pavin, d’après Chapron *et al.*, (2010).

Figure 2 : Formation d’un cratère de maar

Figure 3 : A) Profils de température et de pH établis au point central du Lac Pavin en mai 2002 (Données de N. Assayag, 2003) indiquant les zones définies par la stratification thermique (épilimnion, thermocline, hypolimnion). B) Profils d’oxygène dissous et de conductivité (normalisé à 25°C) définissant la stratification chimique (mixolimnion, chémocline ou mésolimnion, monimolimnion).

Figure 4 : A) Concentrations en Fe(II) et Mn(II) et B) concentration en NH_4^+ , PO_4 et H_4SiO_4 dans la colonne d’eau du Lac Pavin, d’après Michard *et al.*, (données non publiées).

Figure 5 : Profils des concentrations en Carbone Organique Dissous (COD), Carbone Inorganique Total Dissous (CITD). $\text{COD} = \text{COTD} - \text{CITD}$. COTD= Carbone Organique Total Dissous. Les concentrations sont exprimées en μM pour le COD, en mM pour le CITD. Les mesures de COD sont issues de la publication de Viollier *et al.*, (1995), celles de CITD ont été réalisées par N. Assayag (2003).

Figure 6 : Profil de méthane en juin 2006, d’après Jézéquel *et al.*, (in preps).

Figure 7 : Pression des gaz dissous dans le Lac Pavin en fonction de sa profondeur, d’après Michard (2010).

Figure 8 : Classification de l’origine biologique ou thermogénique par combinaison des données isotopiques sur la composition en $^{13}\text{C}-\text{CH}_4$ et $\text{D}-\text{CH}_4$, d’après Whiticar (1999). La croix rouge correspond à la signature isotopique du méthane dans le monimolimnion du Lac Pavin, d’après Agrinier *et al.*, (données non publiées).

Figure 9 : Recouvrement des profils de concentration en (A) méthane et O_2 , (B) méthane et NO_3^- , SO_4^{2-} (juin 2006), (C) méthane et fer et manganèse particuliers (Septembre 1993), d’après Lopes *et al.*, (2011).

Figure 10 : Modélisation des taux d’oxydation aérobie et anaérobie du méthane pour février et juin 2007, d’après Lopes *et al.*, (2011).

Figure 11 : Modélisation des taux d’oxydation anaérobie du méthane couplé au fer, nitrate et sulfate, pour février et en juin 2007, d’après Lopes *et al.*, (2011).

Figure 12 : contenu en silice d'origine diatomique et en TOC (A), ratio TOC/N et contenu en aluminium (B), contenu en fer (C), phosphore (D), soufre (E), du sédiment profond (92m) en 1999, d'après Schettler *et al.*, (2007).

Figure 13 : Caractéristiques (pH, alcalinité, concentration (μM) en fer réduit (Fe(II)), en manganèse (Mn), en ammonium (NH_3), en hydrogène sulfuré (H_2S) et carbone organique dissous (DOC)) de l'eau interstitielle du sédiment profond (92 m) en 1995, d'après Viollier *et al.*, (données non publiées).

Figure 14 : Concentration en méthane dissous (en μM) dans le sédiment profond (92 m) en décembre 2007, d'après Jézéquel *et al.*, (données non publiées)

Figure 15 : Fréquences de phylotypes affiliés avec des groupes phylogénétiques dans les banques de clones construites à partir d'échantillons récoltés à 60 m (A), 70 m (B) et 90 m (C) de profondeur dans la colonne d'eau et à l'interface eau-sédiments à 92 m (D), d'après Lehours *et al.*, (2005).

Figure 16 : Voie de dégradation de la matière organique, depuis les polysaccharides jusqu'au méthane. Les intermédiaires sont montrés dans les rectangles et les microorganismes dans les ovales. Les voies de diversion des substrats avec les nitrates, les sulfates et les oxydes de fer sont marquées par des flèches sortant de la chaîne. Les croix sur la diversion de l'acétate par le Fe(III) signalent que dans le Lac Pavin, les feroréductrices ne semblent pas utiliser l'acétate comme donneur d'électrons, modifié d'après Conrad (2007).

Figure 17 : Abondance procaryotique totale (DAPI) et proportions relatives de bactéries (sonde EUB 338) et d'archées (sonde ARCH915) exprimées en pourcentage du nombre de cellules totales dans l'oxycline et le monimolimnion, d'après Lehours *et al.*, (2005).

Figure 18 : Abondances des archées affiliées aux *Methanomicrobiaceae* (sonde MG1200) , aux *Methanosarcinaceae* (sonde MSMX860) et aux *Methanobacteriaceae* (sonde MB1174) dans l'oxycline et le monimolimnion, d'après Lehours *et al.*, (2005).

Figure 19 : Variations verticales de la mortalité procaryote liée au cycle lytique des virus (VBM) et de la mortalité procaryote potentiellement liée au broutage par des hétérotrophes nanoflagellés, d'après Colombet *et al.*, (2006).

CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DES COMMUNAUTES PROCARYOTES IMPLIQUEES DANS LE CYCLE DU METHANE AU NIVEAU DE LA COLONNE D'EAU ET DES SEDIMENTS SUPERFICIELS

Etude 1 : Identification of microbial communities involved in the methane cycle of a freshwater meromictic lake.

Table 1 : Primer sets and PCR conditions used to amplify *pmoA*, *mcrA* and 16S rRNA gene markers.

Figure 1 : Cross section on Lake Pavin showing the location of sampling.

Figure 2 : Vertical profiles of dissolved oxygen (DO), conductivity at 25°C (C25), temperature and CH_4 concentration along the water column of the Lake Pavin in July 2007 (A) and May 2009 (B).

Figure 3: Evolutionary distance tree showing the phylogenetic relationship of the deduced McrA amino acid sequences including representative sequences derived from this study and sequences of isolates and uncultivated organisms. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007). Evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the

number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 127 positions in the final dataset. Bootstrap values greater than 70% derived from 1000 replicates are indicated at nodes. The number of clones assigned to each OTU is given in brackets together with the name of the representative clone used in this study. *Methanopyrus kandleri* sequence (AAB02003) was used as outgroup. Arrow indicated the unique closest cultured methanogen species to environmental *Methanomicrobiales* sequences. Arrow indicated the only cultured species *Candidatus Methanoregula boonei* to which are more closely related environmental sequences derived from this study. †Symbol indicated phylotypes clustering gDNA and cDNA sequences, ● symbol indicated the phylotype with only a cDNA sequence.

Figure 4 : Distribution pattern of the different OTUs related to the *Methanomicrobiales* order along the water column and in sediments. A) Sequences retrieved from gDNA libraries. B) Sequences retrieved from cDNA libraries.

Figure 5 : Distribution of sequences affiliated with the two OTUs related to the *Methanosarcinales* for each library. A) Sequences retrieved from gDNA libraries. B) Sequences retrieved from cDNA libraries.

Figure 6 : Evolutionary distance tree showing the phylogenetic relationship of the deduced PmoA amino acid sequences including representative sequences derived from this study and sequences of isolates and uncultivated organisms. Phylogenetic analyses were conducted in MEGA4 (Tamura, *et al.*, 2007). The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987). The evolutionary distances were computed using the Poisson correction method and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (Complete deletion option). There were a total of 139 positions in the final dataset. Bootstrap values greater than 70% derived from 1000 replicates are shown at nodes. The number of gDNA and cDNA clones assigned to each OTU is given in brackets, together with the name of the representative clone used in this study. *Nitrospira* sp. Enl299 sequence (ABM54176) was used as outgroup. At right is indicated the name of the representative clone used for each phylotype.

Figure 7 : Relative composition of *pmoA* clone libraries generated from gDNA samples at different depths along the water column of Lake Pavin. The sequences related to *Methylobacter* species and the sequences related to group B6 were broadly distributed through the water column whereas *Methylocystis* and *Methylosarcina* species were specific to certain layers. The percentage of clones calculated for each depth is presented.

Figure 8 : Distribution pattern of transcripts along the water column for OTU1 and OTU2, both related to the *Methylobacter* genus,. OTU2 was dominant up to 55 m and OTU1 from 55 to 65 m.

Figure 9: Percentage contribution of 16S rRNA gene sequences in the water column of Lake Pavin assigned to main bacterial phyla.

ETUDES COMPLEMENTAIRES SUR LES COMMUNAUTES METHANOTROPHES DANS LA COLONNE D'EAU DU LAC PAVIN

Figure 1 : Représentation schématique de la distribution des méthanotrophes aérobies et des méthanogènes dans la colonne d'eau du Lac Pavin. La présence des méthanogènes et des méthanotrophes est déterminée par l'analyse de séquences des gènes *mcrA* et *pmoA*, respectivement. L'obtention de séquences issues de transcrits de ces gènes détermine les zones où ces organismes sont probablement actifs.

Hypothèses sur les facteurs limitant la distribution et l'activité des méthanogènes et méthanotrophes :

1. possible seuil de toxicité de l'O₂ pour les méthanogènes au-dessus de 63 m.
2. pas d'activité des méthanogènes au dessus de 70 m en raison de la présence d'accepteurs inorganiques d'électrons engendrant une compétition avec les bactéries ferro- et sulfato-reductrices pour l'H₂ et l'acétate.
3. pas d'activité des méthanotrophes en dessous de 65 m en raison de l'absence complète d'oxygène.

La zone d'oxydation anaérobie du méthane est potentiellement située entre les zones d'activité des méthanotrophes et des méthanogènes.

Figure 2 : Affiliation phylogénétique de 2 souches de méthanotrophes de Type II (MT2 et MT3) isolées du Lac Pavin (A). Arbre construit avec la méthode du neighbor joining, 1000 bootstraps. Observation en microscopie électronique à balayage (photo Claude Lebos, Université de Tours) de la souche MT3 (B).

Figure 3 : Dispositif de culture en opposition de gradient de méthane et d'oxygène (A et B) et mise en évidence d'une bande de développement des méthanotrophes anaérobies MT3 au niveau de la confluence des 2 gradients (flèche rouge, C).

Figure 4 : (A) Microcalorimètre isotherme différentiel à flux de chaleur (TAM 2277 Thermometric). (B) Exemple de thermogramme obtenu lors d'incubation de la souche MT3 sous flux de CH₄ et/ou d'O₂.

Figure 5 : Thermogrammes obtenus lors d'incubations d'eau de la zone anoxique du Lac Pavin sous différentes atmosphères gazeuses. Echantillons d'eau prélevés à 70 m (A) et à 65 m (B).

Figure 6 : Relations phylogénétiques entre archées méthanogènes/méthanotrophes dérivées du gène *mcrA* de Mx (A) et entre les "*Thermoplasmatales*-related group" potentiellement méthanogènes (TPM) dérivées du gène de l'ARNr 16S (B). Les séquences en gras et italique, proviennent de Mihajlovski *et al.*, (2008; 2010), les séquences en gras proviennent du Lac Pavin et les séquences de même couleurs montre la cooccurrence de *mcrA* de Mx et 16Sr RNA de TPM dans une même étude. TPM-1 englobe RC-III définie par Grosskopf *et al.*, (1998). Les séquences ont été alignées avec clustal-W et les arbres ont été construits en utilisant la méthode du Neighbor-joining. Bootstrap = 1000.

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION DES COMMUNAUTES D'ARCHEES CANDIDATES ET METHANOGENES DANS LES SEDIMENTS DU MONIMOLIMNION

Introduction du chapitre 2

Figure 1 : Morphologies et affiliations phylogénétiques des méthanogènes enrichies et isolées à partir des sédiments du monimolimnion du Lac Pavin. Observation au microscope inversé en lumière UV (350 nm) révélant l'autofluorescence du cofacteur F₃₅₀ de (A) *Methanosphaerula* sp. (B) *Methanosarcina* sp. et (C) *Methanobacterium* sp., barres d'échelle 5 µm. Positions phylogénétiques des méthanogènes isolées et présentes dans les cultures d'enrichissements (D). L'arbre a été construit avec la méthode du neighbor-joining et 1000 bootstraps.

Etude 2 : Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages

Table 1 : Primers and amplifications features used in this study. * GC clamp at the 5-end: CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG (Muyzer *et al.*, 1993). ** the “R” in bold replace a “G” in the original primer.

Table 2 : Spearman’s rank Correlation between the abundance of prokaryotic groups, depth, OM and OC. Only correlation < 0.05 were shown. * p value < 0.01. ** p value < 0.001. OM, Organic matter content, OC, Organic carbon content, Mst, *Methanosaetaceae*, MM, *Methanomicrobiales*, Cre, *Crenarchaeota*, Arc, *Archaea*, Bac, *Bacteria*.

Figure 1 : Multidimensional scaling plot (MDS) of the archaeal community based on TTGE on 16S rRNA genes. This plot corresponds to a two-dimensional visualization of the Jaccard distance matrix. The ellipses designates clusters of depth with > 55% similarity and delineate the upper layer (0 – 3 cm depth), intermediate layer (4 – 19 cm depth) and deeper layer (25 – 37 cm depth) of the core.

Figure 2 : Box plots. Phylotype richness (A) and diversity (B), abundance of archaea (C), methanogens (D), crenarchaeota (E), MBG-D (F). The average values of each parameters (richness, diversity, abundances) are calculated for the three layers discriminated by TTGE analysis. a, b, c indicate significant differences (p < 0.05)

Figure 3 : Phylogenetic analysis of the euryarchaeotal and crenarchaeotal/thaumarchaeotal 16S rRNA genes from sediments of Lake Pavin based on neighbour-joining method. Bootstrap values (in percent) are based on 1000 replicates and are indicated at nodes for branches values ≥ 50% bootstrap support. The number of sequences within each OTU is shown in parentheses, and the depth interval in which each clone was found is indicated by a letter: A, B, C for 0-1 cm, 10-11 cm and 36-37 cm depth intervals, respectively. The scale bars represent a 5% sequence difference, and *Thermotoga elfii* was used as an outgroup.

Figure 4 : Frequency of the archaeal lineages in the clone libraries constructed at 0-1 cm depth (A), 10-11 cm depth (B), 36-37 cm depth (C) from the sediment of Lake Pavin. Segment in the circles correspond to OTUs grouping sequences with >97% similarity.

Figure. 5 : Abundance of *Bacteria* and *Archaea* (A), methanogenic and uncultured archaeal lineages (B), *Methanomicrobiales* and *Methanosaetaceae* (C), and MBG-D and *Crenarchaeota* (D) within the fortieth first centimeters of Lake Pavin sediments. Lines are exponential regression lines. The abundance of methanogens and uncultured archaeal lineages were determined by the addition of *Methanomicrobiales* and *Methanosaetaceae*, and MBG-D and *Crenarchaeota*, respectively.

Figure 6 : Estimation of the activity of the main archaeal lineages by PCR quantification of the reverse transcribed 16S rRNA (A), and by the ratio 16S rRNA to 16S rDNA (B). M’saetaceae = *Methanosaetaceae*; M’microbiales = *Methanomicrobiales*.

Table S.1 : Affiliation of the archaeal 16S rRNA genes sequences for the for the 3 investigated depths and number of clone of each OTU. MBG-D, Marine Benthic Group D; RC-V, Rice Cluster-V; DSEG, Deep Sediment Euryarchaeotal Group; Val-III, from Valkea; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group; MGI, Marine Group I; MBG-B, -A, Marine Benthic Group -B, -A.

Table S.2: Distribution of the main uncultured euryarchaeotal and crenarchaeotal/thaumarchaeotal lineages in freshwater lake sediments based on 16S rRNA gene. The affiliation was based on published trees and new construction of trees with archaeal sequences from lake sediments retrieved from NCBI. "x" : detected; "-" : undetected; "?" ambiguous affiliation. RC-V, Rice Cluster V; MBG-D, Marine Benthic Group D; LDS, Lake Dagow Sediments; TMEG, Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group; RC-II, Rice Cluster II; SM-I, Sippenauer Moor I, AAA, AOM-associated

Archaea; DSEG, Deep Sediment Euryarchaeotal Group; Val-III, from Valkea; MCG, Miscellaneous Crenarchaeotal Group; MGI, Marine Group I; MBG-C, B, A, Marine Benthic Group C, B, A.

Figure S.1 : Physico-chemical characteristics of the interstitial water of the profundal sediment (92 m); pH, alkalinity, concentration (μM) of reduced iron (Fe(II)), reduced manganese (Mn), ammonium (NH_3), hydrogen sulfide (H_2S), dissolved organic carbon (DOC) and methane (CH_4).

Figure S.2 : Specificity and binding site (shading) of primers 490f and 818r that were used in real-time PCR shown on a partial alignment of representative archaeal 16S rDNA sequences from positions 490 to 508 and from 818 to 837 (*E. coli* numbering), respectively.

Figure S.3 : Vertical changes in number of archaeal phylotypes (richness, R) and diversity (Shannon diversity index, H') along the first 37 cm of sediment. The number of phylotypes corresponds to the number of band on the TTGE gel. The diversity was calculated on the basis of the number of band and their relative intensity.

Figure S.4 : Organic matter (OM) and organic carbon (OC) content in the fortieth first centimeters of Lake Pavin sediments. Filled diamond, OM; open diamond, OC.

Etude 3 : *Methanobacterium lacus* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the deep cold sediment of a meromictic lake.

Table 1: Phenotypic characteristics of isolate 17A1^T and of type strains of five *Methanobacterium* species.

Figure 1: Neighbour-joining dendrogram showing the phylogenetic relationships between isolate 17A1^T and species of methanogens. Bootstrap values (>50%) shown on branches were calculated from 1,000 resamplings. The accession numbers of 17A1^T and reference sequences are given in parentheses. The scale bar represents 0.005 substitutions per base position.

Figure 2: Electron micrographs of isolate 17A1^T. (a) Transmission electron micrograph of an ultrathin section, bar, 200 nm; (b) scanning electron micrograph, bar, 2 μm .

Discussion et conclusion du chapitre 2

Figure 1 : Abondance des *Methanobacteriales* (en nombre de copies ADN_r16S par gramme de sédiment sec). Les amorces utilisées sont MBT857F 5'- CGWAG GGAAG CTGTT AAGT -3' et MBT1196R 5'- TACCG TCGTC CACTC CTT -3' (Yu *et al.*, 2004). Les conditions pour la PCR quantitative sont les mêmes que celles décrite dans l'étude 2, avec une température d'hybridation de 56°C.

Figure 2 : Positionnement phylogénétique des séquences *mcrA* de *Methanobacteriales* des sédiments du Lac Pavin et de la souche 17A1^T. L'arbre a été construit par la méthode de neighbor joining avec 1000 bootstraps.

CHAPITRE 3: ACTIVITE VIRALE ET POTENTIELLE IMPLICATION DES VIRUS DANS LA REGULATION DES COMMUNAUTES D'ARCHEES DU SEDIMENT DU MONIMOLIMNION

Etude 4 : Viral activity and unexpected viral morphotypes in the sediments of a deep-dark freshwater biosphere

Figure 1 : Vertical distribution of viral and prokaryote densities (A), virus to prokaryote ratio (B), frequency of visibly infected cells (%) (C), and viral and prokaryotes assemblages (D = RAPD dendogram, E = DDGE *Archaea* dendogram, F = DDGE *Bacteria* dendogram) from sediment core of Lake Pavin.

Figure 2 : Transmission electron micrographs of 'unexpected viruses' (a to k), 'uncharacterized viruses' (l-m), and 'uncharacterized viral forms' (n to q) from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 100 nm.

Figure 3 : Transmission electron micrographs of a particular visibly infected cell from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 200 nm.

Table S.1: Some characteristics of the sediments of Lake Pavin

Figure. S.2 : Transmission electron micrographs of VLPs from sediment core of Lake Pavin. Typical freshwater environment viruses, *Myoviridae* (a to h), *Siphoviridae* (i to n), *Podoviridae* (o), Untailed (p to t), Untailed and enveloped particles (u to z). Scale bar = 100 nm.

Figure S.3 : Transmission electron micrographs of visibly infected cells from sediment core of Lake Pavin. Scale bar = 200 nm.

Figure S.4 : Transmission electron micrographs of cell with VLP at their edge. Scale bar = 200 nm.

Discussion et conclusion du chapitre 3

Figure 1 : Comparaison de morphotypes de virus d'archées cultivés avec des particules virales présentes dans les sédiments du Lac Pavin. SRV2 (Prangishvili *et al.*, 1999), His1 (Bath and Dyall-Smith, 1998), SSV1 (Palm *et al.*, 1991).

Figure 2 : Comparaison de la morphologie d'une cellule infectée par des virus allongés dans les sédiments du Lac Pavin (A et B) avec la morphologie d'une cellule de *Methanosaeta concilii* (C, souche Opfikon issue du centre de ressource biologique DSMZ). Les flèches montrent le fourreau entourant ces deux cellules.

ANNEXES

MILIEUX DE CULTURE

I. MILIEU UTILISE POUR LA CULTURE DES METHANOGENES

Préparation du milieu de culture "Mc"

Avant de commencer, mettre en route un bain marie à 40°C pour décongeler la solution M1.

1. Mélanger les constituants suivant :

BASAL MEDIUM MC

<i>Composition pour</i>	<i>1 litre</i>	<i>750 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>250 ml</i>
Solution M1	20 ml	15 ml	10 ml	5 ml
Solution M2	20 ml	15 ml	10 ml	5 ml
Solution d'éléments traces	10.0 ml	7.5 ml	5 ml	2.5 ml
Résazurine (indicateur red/ox)	1 ml	0,75 ml	0,5 ml	0,25 ml
Haemine	6 gouttes	4 gouttes	3 gouttes	2 gouttes
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.002 g	0,0015 g	0,001 g	0.0005 g
Acétate de sodium	0,5g	0,37g	0,25g	0,12g
Extrait de levure	1 g	0,75 mg	0,5 mg	0,25 mg
Vitamines (à filtrer sur 0,2µm)	10 ml	7,5 ml	5 ml	2,5 ml
NH ₄ Cl	0,2 g	0,15g	0,1g	0,05g
Eau distillée	1000 ml	750 ml	500 ml	250 ml

2. Ajustement du pH à 7 (avec NaOH 5N).

3. Ebullition et refroidissement sous N₂/CO₂ (80:20)

4. Après refroidissement en dessous de 60°C, ajout de :

	<i>1 litre</i>	<i>750 ml</i>	<i>500 ml</i>	<i>250 ml</i>
NaHCO ₃	2.0 g	1,5 g	1 g	0.5 g
Cystéine HCl	0,5 g	0,35 g	0,250 g	125 mg

5. Attendre que le milieu réduise (perte de la coloration rose), puis attendre encore 10 – 15 min pour qu'il ne s'oxyde pas pendant la répartition.

(6. Transfert de milieu dans un autre Erlen flushé si variantes.)

7. Préparation des tubes à flusher sous N₂/CO₂ (80:20) avec bouchon en butyle à moitié enfoncé.

ANNEXES

8. Répartition du milieu (flusher la seringue avec le gaz de l'Elren) dans les tubes avec une seringue en verre (50ml).

Attendre que le milieu re-réduise s'il s'oxyde pendant le transfert
Appuyer sur le bouchon et enlever l'aiguille.

9. Autoclaver.

Composition des solutions stocks :

- Solution minérale 1 (M1)

<i>Composition pour</i>	<i>1 litre</i>	<i>250 ml</i>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.3 g	1,8 g
KH_2PO_4	20 g	5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,4 g	0,6 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,2 g	0,3 g
NaCl	10,0 g	2,5 g
Eau distillée	1000 ml	250 ml

- Solution minérale 2 (M2)

<i>Composition pour</i>	<i>1 litre</i>	<i>250 ml</i>
K_2HPO_4	30 g	7,5 g
Eau distillée	1000 ml	250 ml

- Solution de vitamines

<i>Composition pour</i>	<i>1 litre</i>
Biotine	2 mg
Acide folique	2 mg
Pyridoxine-HCl	10 mg
Thiamine-HCl $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$	5 mg
Riboflavin	5 mg
Acide nicotinique	5 mg
D-Ca-pantothenate	5 mg
Vitamine B12	0,1 mg
Acide p-aminobenzoic	5 mg
Acide lipoïque	5 mg
Eau distillée	1000 ml

ANNEXES

- Solution d'éléments traces

<i>Composition pour</i>	<i>1 litre</i>
Acid nitrilotriacétique	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0.5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.1 g
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.1 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0.18 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0.01 g
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0.02 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O 0.03 g	0.03 g
Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O	0,3 mg
Eau distillée	1000 ml

II. MILIEU UTILISE POUR LA CULTURE DES METHANOTROPHES AEROBIES

Préparation du milieu de culture "NMS" :

1. Dissoudre le KNO_3 dans l'eau distillée.
2. Ajouter SF, SC, SM, ST, SP.
3. Répartir dans des tubes de Balch autoclavés.

Composition du milieu :

Composition pour	1 litre	500 ml	250 ml	100 ml
KNO_3	1g	0,5g	0,25g	0,1g
SF	10ml	5ml	2,5ml	1 ml
SC	10ml	5ml	2,5ml	1 ml
SM	10ml	5ml	2,5ml	1 ml
ST x4	2,5ml	1,25ml	600 μ l	250 μ l
SP	20ml	10ml	5ml	2 ml
Eau distillée	940ml	470ml	235ml	95 ml

Pour les milieux solides : ajouter l'agar à 1,5%, agiter fortement pendant la répartition.

Solutions stocks :

- Solution de phosphate (SP)

Par litre d'eau distillée :
 - Na_2HPO_4 3,6 g
 - KH_2PO_4 1,4 g
 Ajuster le pH à 6,8

- Solution de sulfate de fer (SF)

Préparation d'une solution de 100 ml d' H_2SO_4 à 10^{-3} M
 Ajouter - $\text{FeSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g

- Solution de sulfate de magnésium (SM)

Pour 100 ml d'eau distillée : - $\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g

- Solution de chlorure de calcium (SC)

Pour 100 ml d'eau distillée : - $\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g

- Solution d'éléments traces (ST)

Par litre d'eau distillée : - Tétrасodium EDTA		100 mg / Disodium EDTA 75mg
- $\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	7 mg	
- $\text{MnCl}_2 - 4\text{H}_2\text{O}$	3 mg	
- H_3BO_3	30 mg	
- $\text{CoCl}_2 - 6\text{H}_2\text{O}$	20 mg	
- $\text{CuCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$	1 mg	
- $\text{NiCl}_2 - 6\text{H}_2\text{O}$	2 mg	
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$	3 mg	

III. MILIEU UTILISE POUR LES ESSAIS D'ENRICHISSEMENT DES METHANOTROPHES ANAEROBIES

Préparation du milieu de culture "KJ" :

Avant de commencer, mettre en route un bain marie à 40°C pour décongeler la solution M1.

1. Mélanger les constituants suivant :

<i>Composition pour</i>	<i>1l</i>	<i>0,5l</i>	<i>0,25l</i>
Solution minérale I*	5 ml	2,5 ml	1,25 ml
Solution minérale II*	5 ml	2,5 ml	1,25 ml
Eléments trace*	10 ml	5 ml	2,5 ml
Résazurine	4 drops	3 drops	2 drops
Extrait de levure	100 mg	50 mg	25 mg
Vitamines*	2 ml	1 ml	0,5 ml
Eau du Lac Pavin (92 mètres)	200 ml	100 ml	50 ml
Eau distillée	800 ml	400 ml	20 ml

*Voir composition dans solution stock milieu Mc

2. Ajuster le pH à 7.

3. Porter à ébullition.

4. Après refroidissement en dessous de 60°C, ajout de :

NaHCO ₃	5 g	2,5 g	1,25 g
Cysteine HCl	0,125 g	0,062 g	0,031 g

5. Refroidir sous N₂/CO₂ (80:20).

6. Répartir dans des tubes de Hungate (9ml/tube) sous N₂/CO₂ (80:20).

7. Autoclaver.

8. Avant d'inoculer, ajouter 0,1 ml des solutions stocks stériles suivantes (en fonction des conditions testées):

- 0,1 ml de NaNO₃
- 0,1 ml de NaNO₂
- 0,1 ml d'oxydes de fer amorphe

Solutions stocks d'accepteurs inorganiques d'électrons :

- Solution de nitrate de sodium (1.5 M) :

Ajouter 1,275 g de NaNO_3 dans un tube de Hungate.

Flusher pendant 10 minutes sous CO_2 .

Ajouter 10 ml de solution minérale anoxique (contenant 5 ml de M1 et 5 ml de M2 / litre).

Autoclaver.

- Solution de nitrite de sodium (1.5 M) :

Ajouter 1.04 g de NaNO_2 dans un tube de Hungate.

Flusher pendant 10 minutes sous CO_2 .

Ajouter 10 ml de solution minérale anoxique (contenant 5 ml de M1 et 5 ml de M2 / litre).

Autoclaver.

- Solution d'oxyde de fer amorphe (0,15M) :

Dans un bécher:

Ajouter 0,73 g de FeCl_3 et 30 ml d'eau distillé.

Couvrir avec du parafilm et mettre sous agitation.

Ajuster la solution de FeCl_3 à pH7 avec le NaOH à 1M ($\approx 12\text{ml}$ pour 30ml de FeCl_3 à 0,15M)

Attention : ne pas dépasser 7 (aller doucement à la fin sinon formation d'autres formes de fer)

Vérifier le pH une demi-heure après l'ajustement pour vérifier que le pH est bien stabilisé à 7.

Laisser 4 heures sous agitation.

Repartir de manière égale la solution de Fe(III) amorphe dans 2 falcons.

Centrifuger à 5000 rpm pendant 15min

Enlever le surnageant et le remplacer avec de l'eau distillée.

Répéter 6 fois l'opération

Sous CO_2 , avec un film, à l'aide d'une seringue, reprendre le fer dans de l'eau anoxique et l'injecter dans une bouteille de balch stérilisée et flusher au N_2 .

Faire buller du N_2 dans le flacon avec une aiguille longue, à travers le septum pour chasser un maximum d' O_2 .

CURRICULUM VITAE

Activité de recherche et d'enseignement

PUBLICATIONS

Revue internationale à comité de lecture

Publications acceptées

G. BORREL, K. JOBLIN, A. GUEDON, J. COLOMBET, V. TARDY, A-C. LEHOURS, G. FONTY : *Methanobacterium lacus* sp. nov., a novel hydrogenotrophic methanogen from the deep cold sediment of a meromictic lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, sous presse, doi: 10.1099/ijse.0.034538-0.

G. BORREL, D. JEZEQUEL, C. BIDERRE-PETIT, N. MOREL-DESROSIERS, J-P. MOREL, P. PEYRET, G. FONTY, A-C. LEHOURS : Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* (2011) 162, 832-847.

C. BIDERRE-PETIT, D. JÉZÉQUEL, E. DUGAT-BONY, F. LOPES, J. KUEVER, **G. BORREL**, E. VIOLLIER, G. FONTY, P. PEYRET : Identification of microbial communities involved in the methane cycle in a freshwater meromictic lake. *FEMS Microbiology Ecology* (2011) 77, 533-545.

G. BORREL, A-C LEHOURS, C. BARDOT, X. BAILLY, G. FONTY : Members of Candidate Divisions OP11, OD1 and SR1 are widespread along the water column of the meromictic Lake Pavin (France). *Archives of Microbiology* (2010) 192, 559-576.

C. BIDERRE-PETIT, D. BOUCHER, J. KUEVER, P. ALBERIC, D. JÉZÉQUEL, B. CHEBANCE, **G. BORREL**, G. FONTY, P. PEYRET : Identification of sulfur-cycle prokaryotes in a low-sulfate lake (Lake Pavin) using *aprA* and 16S rRNA gene markers. *Microbial Ecology* (2010) 61, 313-327.

Publications en préparation ou soumises

G. BORREL, J. COLOMBET, A. ROBIN, A-C. LEHOURS, D. PRANGISHVILI, T. SIME-NGANDO : Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater biosphere. *Soumise dans The ISME Journal*.

G. BORREL, A-C LEHOURS, O. CROUZET, D. JEZEQUEL, K. ROCKNE, A KULCZAK, E. DUFFAUX, K. JOBLIN, G. FONTY : Archaea in the Deep Sediments of a Freshwater Meromictic Lake: Shift from Methanogenic to Uncultured Archaeal Lineages. *Soumise dans PLoS ONE*.

Article de vulgarisation

- 2009** G. FONTY, G. ABRIL, P. AGRINIER, P. ALBERIC, B. ARBEILLE, C. BARDOT, L. BERGONZINI, C. BIDERRE-PETIT, C. BONHOMME, **G. BORREL**, V. BUSIGNY, D. COSSA, C. DEFARGE, L. ESNAULT, M-L. FARDEAU, , P. GAUTERET, A. GROLEAU, F. GUILLON, L. HARRAULT, S. HUON, D. JEZEQUEL, J. KNOERY, S. LAFORTUNE, D. LAVERGNE, A-C. LEHOURS, F. LOPES, G. MAILHOT, G. MICHARD, C. MILITON, A. MONE, M. PEPE, N. MOREL, J-P. MOREL, B. OLLIVIER, P. PEYRET, E. PEYRETAILLADE, A-L. POTRIQUET, M. POULIN, F. PREVOT, M. RABIET, S. RIOT, G. SARRAZIN, B. TASSIN, A. THIAM, B. VINÇON-LEITTE, E. VIOLLIER. Le Lac Pavin au cœur du projet METANOX. *Revue d'Auvergne* 592-593 : 55-71.

CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX – COLLOQUES –SEMINAIRES

- Juin 2011** **Séminaire interne du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement,**
G. BORREL, O. CROUZET, K. ROCKNE, K. JOBLIN, D. JEZEQUEL, A-C. LEHOURS, G. FONTY, J. COLLOMBET, A. ROBIN, B. MISSON, D. LATOUR, C. MALLET, T. SIME-NGANDO. «*La communauté d'Archaea et les virus des sédiments profonds du Lac Pavin*». (Communication orale)
- Novembre 2010** **Colloque de restitution du programme EC2CO 2010, Toulouse**
G. BORREL, C. BIDERRE-PETIT, F. LOPES, A-C. LEHOURS, N. MOREL-DESROSIERS, J-P. MOREL, D. JÉZÉQUEL, P. PEYRET & G. FONTY : «*Oxydation aérobie et anaérobie du méthane dans la colonne d'eau du Lac Pavin (Auvergne)*». (Communication orale)
- Octobre 2010** **Adaptation au Changement Climatique de l'Agriculture et des Ecosystèmes, Clermont-Ferrand**
G. BORREL, C. BIDERRE-PETIT, F. LOPES, N. MOREL, J-P MOREL, D. JEZEQUEL, A-C. LEHOURS, P. PEYRET, & G. FONTY : «*Aerobic and anaerobic methane oxidation in the pelagic zone of a meromictic lake (Lake Pavin, Auvergne)*». (Communication affichée)
- Juin 2010** **Viruses of microbes 2010, Paris**
A. ROBIN, J. COLOMBET, **G. BORREL**, D. LATOUR, C. MALLET, B. MISSON, T. SIME-NGANDO : «*Occurrence of unique viral morphotypes in deep-aged freshwater sediments*». (Communication affichée)
8^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, Marseille
G. BORREL, O. CROUZET, K. ROCKNE, K. JOBLIN, D. JEZEQUEL, A-C. LEHOURS, G. FONTY : «*Caractérisation de la communauté d'Archaea des sédiments profonds d'un lac méromictique (Lac Pavin, Auvergne)*». (Communication orale)
- Mai 2010** **Workshop « Interactions microbiennes passées et présentes » de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, Marseille**
G. BORREL, C. BIDERRE-PETIT, A-C. LEHOURS, F. LOPES, N. MOREL, J-P. MOREL, D. JEZEQUEL, P. PEYRET & G. FONTY : «*Oxydation aérobie et anaérobie du méthane dans la colonne d'eau du Lac Pavin (Auvergne)*».

- (Communication affichée, **prix du meilleur poster**)
- Avril 2010** **7^{ème} Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois**, Clermont-Ferrand
G. BORREL, O. CROUZET, K. ROCKNE, K. JOBLIN, D. JEZEQUEL, A-C. LEHOURS, ET G. FONTY : «*Changements verticaux de la structure des communautés d'Archaea dans les sédiments anoxiques du Lac Pavin*». (Communication orale)
- Septembre 2009** **4^{ème} Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne**, Lyon
G. BORREL, O. CROUZET, K. JOBLIN, L. JOUVE, D. JEZEQUEL, G. FONTY : «*Abondance et diversité des communautés d'Archaea dans les sédiments d'un lac méromictique (Lac Pavin, Auvergne)*». (Communication affichée)
- Colloque Bioénergie**, Clermont-Ferrand
G. FONTY, A-C. LEHOURS, G. BORREL, C. PETIT, R. NOUAILLE, N. MOREL-DESROSIERS, J-P. MOREL, P. PEYRET : «*Stratégies microbiennes de dégradation et fermentation de la matière organique dans les environnements anoxiques*». (Communication orale)
- Juin 2009** **6th International Symposium of Anaerobic Microbiology**, Liblice (République Tchèque)
G. BORREL, O. CROUZET, K. JOBLIN, L. JOUVE, D. JEZEQUEL, G. FONTY : «*Archaeal community in the profound sediment of the meromictic Lake Pavin (Puy de Dôme, France)*». (Communication orale)
- Mai 2009** **International Meeting on lake Pavin and other meromictic lakes**, Besse-en-Chandesse
G. BORREL, O. CROUZET, K. JOBLIN, L. JOUVE, D. JEZEQUEL, G. FONTY : «*Structure and vertical distribution of the archaeal community in the profound sediment of Lake Pavin*». (Communication orale)
G. FONTY, A-C. LEHOURS, G. BORREL, C. PETIT, P. PEYRET, N. MOREL, J-P. MOREL, G. MAILHOT : «*Lac Pavin : an exceptionnal study site for anaerobic microbial research., Besse-en-Chandesse*» (Communication orale)
- Avril 2009** **Séminaire Université Paris VII**, Paris
G. FONTY, A-C. LEHOURS, G. BORREL, C. PETIT. C. BARDOT (2009) : «*Diversité et métabolismes microbiens dans la zone anoxique permanente d'un lac méromictique unique en France, le Lac Pavin*». (Communication orale)
- Octobre 2008** **First Congress of the Federation for Environmental Research**, Clermont-Ferrand
G. BORREL, A-C. LEHOURS, N. MOREL-DESROSIERS, J-P. MOREL, G. FONTY : «*Application of microcalorimetry to the study of microbial metabolisms from the permanent anoxic layer of Lake Pavin: Example of the anaerobic methane oxidation (preliminary results)*». (Communication affichée)
G. BORREL, A-C. LEHOURS, C. BARDOT, G. FONTY : «*Vertical distribution and phylogenetic diversity of new bacterial phyla (candidate division) OP11 and SR1 in Lake Pavin*». (Communication affichée)

- A.C. LEHOURS, C. BARDOT, I. BATISSON, G. MAILHOT, M. RABIET, **G. BORREL**, A. GUEDON, N. MOREL-DESROSIERS, J.P. MOREL & G. FONTY : «*Cultivable microbial diversity involved in dissimilatory-iron reduction in the monimolimnion of the Lake Pavin*». (Communication orale)
- Août 2008** **12^{ème} International Symposium on Microbial Ecology**, Cairns (Australia)
C. PETIT, **G. BORREL**, E. PEYRETAILLADE, D. JEZEQUEL, E. VIOLLIER, P. PEYRET, G. FONTY : «*Distribution and diversity of some microbial communities assessed by the functional genes in the water column of a meromictic lake (Lake Pavin, Massif Central, France)*». (Communication affichée)
- Juin 2008** **Workshop « Méthodes de culture et bactéries non cultivables » de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne**, Banyuls sur Mer
G. BORREL, A-C. LEHOURS, N. MOREL-DESROSIERS, J-P. MOREL J, G. FONTY : «*Application de la microcalorimétrie à l'étude de métabolismes microbiens dans la zone anoxique du Lac Pavin. Exemple de l'oxydation anaérobie du méthane (résultats préliminaires)*». (Communication affichée)
- Mai 2008** **Journées de l'école doctorale**, Clermont-Ferrand
G. BORREL, A-C. LEHOURS, C. BARDOT, G. FONTY : «*Distribution verticale et diversité phylogénétique des divisions candidates OP11, OD1, et SR1 dans le Lac Pavin*». (Communication affichée)
- Décembre 2007** **Colloque de Restitution du Programme Coordonné ANR-ECCO**, Toulouse
G. FONTY, G. ABRIL, P. AGRINIER, P. ALBERIC, B. ARBEILLE, C. BARDOT, L. BERGONZINI, C. BIDERRE-PETIT, C. BONHOMME, **G. BORREL**, V. BUSIGNY, D. COSSA, C. DEFARGE, L. ESNault, M-L. FARDEAU, , P. GAUTERET, A. GROLEAU, F. GUILLON, L. HARRAULT, S. HUON, D. JEZEQUEL, J. KNOERY, S. LAFORTUNE, D. LAVERGNE, A-C. LEHOURS, F. LOPES, G. MAILHOT, G. MICHARD, C. MILITON, A. MONE, M. PEPE, N. MOREL, J-P. MOREL, B. OLLIVIER, P. PEYRET, E. PEYRETAILLADE, A-L. POTRIQUET, M. POULIN, F. PREVOT, M. RABIET, S. RIOT, G. SARRAZIN, B. TASSIN, A. THIAM, B. VINÇON-LEITTE, E. VIOLLIER : «*Biodiversité et métabolismes dans les systèmes aquatiques anoxiques : dynamique microbiologique, physique et géochimique dans la colonne d'eau d'un lac méromictique (Lac Pavin, Massif Central)*». (Communication orale)

IMPLICATION-PARTICIPATION A DES PROJETS DE RECHERCHE

Les recherches menées au cours de mon doctorat et de mon stage de master 2 se sont inscrites dans le cadre de 3 projets pluridisciplinaires :

L'ANR **METANOX** (Biodiversité et METabolismes dans les systèmes aquatiques ANOXiques : dynamique microbiologique, physique et géochimique dans la colonne d'eau d'un lac méromictique (Lac Pavin, Massif Central) - (ANR-ECCO PNBC 2005-2007)

ANNEXES

L'EC2CO **METHANOLAC** (METHANOGENESE et méthanotrophie dans la zone anoxique d'un LAC méromictique (Lac Pavin, Massif Central) : Mécanismes microbiens, cinétiques, interactions entre cycles biogéochimiques) - (ANR-EC2CO 2007-2009)

L'EC2CO **INTERLAC** (INTERActions entre cycles biogéochimiques (carbone, azote, soufre, fer) dans la zone anoxique d'un LAC méromictique oligomésotrophe (Lac Pavin, Massif Central) : Etude de la méthanotrophie et de la réduction dissimilatrice du fer) - (ANR-EC2CO 2009-2010).

ACTIVITE D'ENSEIGNEMENT

2007/2010 Vacataire à l'Université Blaise Pascal, **109 heures d'équivalent TD réalisées.**

